



09/514,245 #24
DECLARATION

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

I, Elaine Patricia PARRISH BSc, PhD,

translator to RWS Group plc, of Europa House, Marsham Way, Gerrards Cross,
Buckinghamshire, England declare;

1. That I am a citizen of the United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland.
2. That I am well acquainted with the French and English languages.
3. That the attached is, to the best of my knowledge and belief, a true translation into the English language of the accompanying copy of the specification filed with the application for a patent in France on 5 December 1997 under the number 97/15,396 and the official certificate attached hereto.
4. That I believe that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the patent application in the United States of America or any patent issuing thereon.

E. Parish

For and on behalf of RWS Group plc
The 17th day of March 2003

09 514245

REPUBLIQUE

09/514,245
FRANCAISE

#24



RECEIVED

APR 30 2003

TECH CENTER 1600/2900

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 14 MARS 2003

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIETE
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle-Livre VI

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES

05 DEC 1997

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

97 15396 -

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT

05 DEC 1997

DATE DE DÉPÔT

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

brevet d'invention demande divisionnaire
 certificat d'utilité transformation d'une demande de brevet européen



Établissement du rapport de recherche

différé immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance oui non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

Séquence génomique et polypeptides de circovirus associé à la maladie de l'amaigrissement du porcelet (MAP), applications au diagnostic et à la prévention et/ou au traitement de l'infection

3 DEMANDEUR (S)

n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

CENTRE NATIONAL D'ETUDES VETERINAIRES ET ALIMENTAIRES

Forme juridique

ETABLISSEMENT PUBLIC NATIONAL

Nationalité (s) Française

Adresse (s) complète (s)

23, Avenue du Général de Gaulle, 94700 MAISONS-ALFORT

FR

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

oui

non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

requise pour la 1ère fois

requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande

n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire - n° d'inscription)

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

H. B.

92-1001

L

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR
(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

97 15396

TITRE DE L'INVENTION : Séquence génomique et polypeptides de circovirus associé à la maladie de l'amaigrissement du porcelet (MAP), applications au diagnostic et à la prévention et/ou au traitement de l'infection

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

CENTRE NATIONAL D'ETUDES VETERINAIRES ET ALIMENTAIRES
23, Avenue du Général de Gaulle, 94700 MAISONS-ALFORT

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

JESTIN André
14, rue Jacques Cartier
22000 Saint Brieuc, FR

ARNAULD Claire
34, boulevard Clémenceau
22000 Saint Brieuc, FR

ALBINA Emmanuel
11, rue du Roussillon
22950 Tregueux, FR

LE CANN Pierre
La Noë de Craffault
22960 Pledran, FR

BLANCHARD Philippe
26, rue du 8 Mai 1945
22190 Plerin, FR

HUTET Evelyne
20, rue Vice Amiral Kersaint
Saint Laurent
22190 Plerin, FR

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

5 décembre 1997



CABINET REGIMBEAU

92-1001

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDICATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
58 & 63			X	10.04.98	20 AVR. 1998 - SR

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article 28 du décret du 19 septembre 1979, est signalé par la mention "R.M." (revendications modifiées).

ORIGINAL

1

SEQUENCE GENOMIQUE ET POLYPEPTIDES DE CIRCOVIRUS ASSOCIE A LA MALADIE DE L'AMAIGRISSEMENT DU PORCELET (MAP), APPLICATIONS AU DIAGNOSTIC ET A LA PREVENTION ET/OU AU TRAITEMENT DE L'INFECTION.

5

L'invention a pour objet la séquence génomique et des séquences nucléotidiq[ue]es codant pour des polypeptides de circovirus MAP, tels que les polypeptides structuraux et non structuraux dudit circovirus, ainsi que des vecteurs incluant lesdites séquences et cellules ou animaux transformés par ces vecteurs. L'invention concerne également des procédés de détection de ces acides nucléiques ou polypeptides et des kits de diagnostic d'infection par le circovirus MAP. L'invention vise aussi une méthode de sélection de composés capables de moduler l'infection virale. L'invention comprend enfin des compositions pharmaceutiques, notamment vaccinales, pour la prévention et/ou le traitement d'infections virales par circovirus MAP ainsi que l'utilisation de vecteur selon l'invention pour la prévention et/ou le traitement de maladies par thérapie génique.

La maladie de l'amaigrissement du porcelet (MAP) ou encore appelé dépérissement fatal du porcelet (DFP) a été largement décrite en Amérique du Nord (Harding, J.C., 1997), et des auteurs ont rapporté l'existence d'une relation entre cette pathologie et la présence de circovirus porcin (Daft, B. et al., 1996 ; Clark, E.G., 1997 ; Harding, J.C., 1997 ; Harding, J.C. et Clark, E.G., 1997 ; Nayar, G.P. et al., 1997). Un circovirus porcin a déjà été mis en évidence dans des cultures cellulaires dérivées de porc établies en lignée et infectées chroniquement (Tischer, I., 1986, 1988, 1995 ; Dulac, G.C., 1989 ; Edwards, S., 1994 ; Allan, G.M., 1995 et McNeilly, F., 1996). Ce virus, lors d'infection expérimentale de porcelets, ne se révélait pas pathogène pour le porc (Tischer, I., 1986, Horner, G.W., 1991) et sa séquence nucléotidique a été déterminée et caractérisée (Tischer, I.,

1982 ; Meehan, B.M. et al., 1997 ; Mankertz, A., 1997). Le circovirus porcin, dénommé virus PCV, fait partie du genre circovirus de la famille des circoviridae (Murphy, F.A. et al., 1995) dont le virion possède un ADN circulaire de taille compris entre 1,7 et 2,3 kb, ADN qui comprend 3 cadres ouverts de lecture (ORF1 à ORF3), codant pour une protéine de réPLICATION REP impliquée dans la phase d'initiation et de terminaison de la réPLICATION circulaire déroulante (RCR) (Heyraud-Nitschke, F., et al., 1995 ; Harding, M.R. et al., 1993 ; Hanson, S.F. et al., 1995 ; Fontes, E.P.B. et al., 1994), codant pour une protéine de capsid (Boulton, L.H. et al., 1997 ; Hackland, A.F. et al., 1994 ; Chu, P.W.G. et al., 1993) et codant pour une protéine non structurale dite de dissémination (Lazarowitz, S.G. et al., 1989).

Les auteurs de la présente invention ont remarqué que les manifestations cliniques perceptibles chez le porc et liées à l'infection par le circovirus MAP, sont très individualisées. Ces manifestations apparaissent en général sur des porcs de 8 à 12 semaines d'âge, sevrés depuis 4 à 8 semaines. Les premiers signes sont l'hypotonie sans qu'on puisse parler de prostration. Rapidement (48 heures), les flancs se creusent, la ligne du dos se dessine, les porcs "blanchissent". Ces signes s'accompagnent en général d'hypertermie, d'anorexie et le plus souvent de manifestations respiratoires (toux, dyspnée, polypnée). Des diarrhées transitoires peuvent également apparaître. La phase d'état de la maladie dure environ un mois au terme de laquelle les taux de mortalité varient de 5 à 20 %. A ces mortalités il convient d'ajouter une proportion variable (5-10 %) d'animaux cadavériques ne pouvant plus représenter un avenir économique. Il est à noter qu'en dehors de ce stade critique de fin de post-sevrage, aucune anomalie n'apparaît dans les élevages. En particulier, la fonction de reproduction est parfaitement maintenue.

Sur le plan épidémiologique, les premières manifestations de cette pathologie sont apparues au début

de 1995 dans l'Est du département des Côtes d'Armor en France, et les élevages atteints sont surtout cantonnés dans cette zone du département. En décembre 1996, le nombre des élevages concernés ne peut être évalué avec précision en raison de l'absence de méthode de diagnostic spécifique au laboratoire ni de dispositif d'épidémirosurveillance du cheptel. En se basant sur les faits cliniques ainsi que sur des résultats d'examens nécropsiques fournis par les vétérinaires, on peut estimer ce nombre à plusieurs dizaines (80-100). La contagiosité de la maladie est faible à modérée. Des cas sont signalés en dehors de la zone initiale et font suite pour la plupart au transfert d'animaux venant d'élevages connaissant le problème. En revanche, une particularité de l'affection est sa forte rémanence. Ainsi, des élevages atteints depuis une année sont-ils toujours concernés en dépit de l'application massive de thérapeutiques. Les élevages à expression clinique se recrutent dans les différentes catégories de spécialisation (naiseurs-engraisseurs, post-sevreurs-engraisseurs) et différentes structures économiques sont concernées. Par ailleurs, les troubles apparaissent même dans des élevages où les règles de la zootechnie sont respectées.

De nombreux examens nécropsiques ont été réalisés soit dans les élevages soit au laboratoire. Les éléments du tableau lésionnel sont disparates. Les lésions macroscopiques les plus constantes sont de la pneumonie qui se présente parfois en damier ainsi qu'une hypertrophie des ganglions lymphatiques. Les autres lésions concernent surtout les viscères thoraciques dont notamment péricardite et pleurésie. Mais des arthrites, des ulcères gastriques sont également observés. Les lésions révélées à l'examen histologique se situent essentiellement au niveau pulmonaire (pneumonie interstitielle), ganglionnaire (déplétion lymphoïde des noeuds lymphatiques, cellules géantes) et rénal (glomérulonéphrite, vascularite). Les agents infectieux ont fait l'objet de recherches larges.

L'intervention des pestivirus et de la maladie d'Aujeszky a pu être exclue. Les troubles apparaissent dans les troupeaux SDRP (Syndrome Dysgénésique et Respiratoire Porcin, infection liée à un artériovirus) séropositif, mais 5 le rôle de ce dernier dans la genèse des troubles n'a pu être établi (la majorité des élevages de Bretagne sont SDRP séropositifs).

Les auteurs de la présente invention, dans le but 10 d'identifier l'agent étiologique responsable de la MAP, ont réalisé des épreuves de "contact" entre porcelets manifestement "malades" et des porcs EOPS (Exempts d'Organismes Pathogènes Spécifiques) du CNEVA (Centre National d'Etudes vétérinaires et Alimentaires, France). 15 Ces épreuves ont permis d'observer le développement dans les animaleries protégées des manifestations comparables à celles observées en élevage. Les manifestations discrètes telles que l'hyperthermie modérée, l'anorexie et la diarrhée intermittente, sont apparues après une semaine de 20 contact. Il faut noter que le virus SDRP n'a diffusé que postérieurement aux manifestations cliniques. Par ailleurs, des inoculations de broyats d'organes d'animaux malades à des porcs sains a permis de reproduire des manifestations apparentées à celles observées dans les élevages, avec 25 cependant une incidence moins forte liée aux conditions favorables d'entretien des animaux dans les installations expérimentales.

Ainsi, les auteurs de la présente invention ont pu mettre en évidence que les manifestations pathologiques se 30 présentent comme une entité bien définie affectant le porc à un stade particulier de sa croissance.

Cette pathologie n'a jamais été décrite en France. Toutefois, des informations éparses notamment canadiennes relatent de faits apparentés.

35 Les troubles ne peuvent être maîtrisés par les thérapeutiques existantes.

Les données récoltées tant en élevage qu'en expérimentation ont permis de mettre en relief les points suivants :

- la maladie MAP est transmissible mais sa contagiosité est peu élevée,
- son origine étiologique est de nature infectieuse et probablement virale,
- la maladie MAP présente un caractère persistant dans les élevages atteints.

Il s'en suit des conséquences économiques considérables pour les élevages.

Ainsi, un besoin important à ce jour concerne un diagnostic spécifique et sensible, de réalisation pratique et rapide, permettant le dépistage précoce de l'infection. Un test fiable, sensible et pratique, qui permette la distinction entre souches de circovirus porcin (PCV) est donc fortement désiré.

D'autre part, un besoin de traitement efficace, et bien toléré des infections à circovirus MAP reste également désiré, aucun vaccin aujourd'hui n'est disponible contre le circovirus MAP.

S'agissant du circovirus MAP, il faudra probablement comprendre le rôle de la défense immunitaire dans la physiologie et la pathologie de la maladie pour développer des vaccins satisfaisants.

Une information plus ample concernant la biologie de ces souches, leurs interactions avec leurs hôtes, les phénomènes d'infectivité associés et ceux d'échappement aux défenses immunitaires de l'hôte notamment, et leur implication enfin dans le développement des pathologies associées, permettra une meilleure compréhension de ces mécanismes. Compte tenu de ce qui précède et qui montre en particulier les limitations des moyens de lutter contre l'infection par le circovirus MAP, il est donc primordial aujourd'hui d'une part de développer des outils moléculaires, notamment à partir d'une meilleure connaissance génétique du circovirus MAP, mais également de

mettre au point de nouveaux traitements préventifs et thérapeutiques, des nouvelles méthodes de diagnostic et de nouvelles stratégies vaccinales spécifiques, efficaces et tolérées. Ceci est précisément l'objet de la présente invention.

La présente invention a pour objet la séquence nucléotidique de séquence SEQ ID N° 1, telle que représentée à la figure 2, du génome de circovirus MAP.

La séquence nucléotidique de séquence SEQ ID N° 1 a été déposée le 2 Juillet 1997 à la banque de données GenBank sous le numéro nuc 1 AF012107.

La présente invention a également pour objet des séquences nucléotidiques caractérisées en ce qu'elles sont choisies parmi :

- a) une séquence nucléotidique de fragment spécifique de la séquence SEQ ID N° 1 ;
- b) une séquence nucléotidique homologue à une séquence nucléotidique telle que définie en a) ;
- c) une séquence nucléotidique complémentaire de la séquence SEQ ID N° 1 ou complémentaire d'une séquence nucléotidique telle que définie en a) ou b), et une séquence nucléotidique de leur ARN correspondant ;
- d) une séquence nucléotidique capable de s'hybrider dans des conditions stringentes avec une séquence telle que définie en a), b), ou c) ;
- e) une séquence nucléotidique comprenant la séquence SEQ ID N° 1 ou une séquence telle que définie en a), b), c) ou d) ; et
- f) une séquence nucléotidique modifiée d'une séquence nucléotidique telle que définie en a), b), c), d) ou e).

On entendra par séquence nucléotidique, polynucléotide ou acide nucléique, selon la présente invention, aussi bien un ADN double brin ou simple brin dans des formes monomériques et dimériques (dites en tandem) que des produits de transcription desdits ADNs.

Il doit être compris que la présente invention ne concerne pas les séquences nucléotidiques génomiques prises dans leur environnement naturel, c'est-à-dire à l'état naturel. Il s'agit de séquences qui ont pu être isolées, purifiées ou partiellement purifiées, à partir de méthodes de séparation telles que par exemple la chromatographie par échange d'ions, par exclusion basée sur la taille moléculaire, ou par affinité, ou encore les techniques de fractionnement basées sur la solubilité dans différents solvants, ou à partir de méthodes du génie génétique telles que l'amplification, le clonage et le sous-clonage, les séquences de l'invention pouvant être portées par des vecteurs.

La séquence nucléotidique SEQ ID N° 1 a été obtenue par séquençage du génome par la méthode de Sanger.

Par fragment spécifique de séquence nucléotidique selon l'invention, on entendra désigner tout fragment nucléotidique du circovirus MAP de longueur d'au moins 8 nucléotides, de préférence au moins 12 nucléotides, et encore plus préférentiellement au moins 20 nucléotides consécutifs de la séquence dont il est issu, et présentant, après alignement et comparaison avec les fragments correspondants de circovirus porcins connus, au moins un nucléotide ou base de nature différente. Les fragments nucléotidiques spécifiques du circovirus MAP peuvent facilement être déterminés en se reportant à la figure 3 de la présente invention dans laquelle sont mis en évidence les nucléotides ou bases de la séquence SEQ ID N° 1 (circopordfp) qui sont de nature différente, après alignement de ladite séquence SEQ ID N° 1 avec les deux autres séquences de circovirus porcin connues (circopormeeh et circopormank).

Par séquence nucléotidique homologue au sens de la présente invention, on entend une séquence nucléotidique présentant au moins une séquence nucléotidique de fragment spécifique, telle que définie précédemment, et un pourcentage d'identité avec les bases d'une séquence

nucléotidique selon l'invention d'au moins 80 %, de préférence 90 % et 95 %, ce pourcentage étant purement statistique et les différences entre les deux séquences nucléotidiques pouvant être réparties au hasard et sur toute leur longueur. Lesdites séquences homologues "spécifiques" peuvent comprendre, par exemple, les séquences correspondant à la séquence génomique ou aux séquences de ses fragments représentatifs de variants de circovirus MAP. Ces séquences homologues spécifiques peuvent ainsi correspondre à des variations liées à des mutations au sein de la souche circovirus MAP et correspondre notamment à des troncatures, substitutions, délétions et/ou additions d'au moins un nucléotide. Lesdites séquences homologues peuvent également correspondre à des variations liées à la dégénérescence du code génétique.

Par séquence nucléotidique complémentaire d'une séquence de l'invention, on entend tout ADN dont les nucléotides sont complémentaires de ceux de la séquence de l'invention, et dont l'orientation est inversée (séquence antiparallèle).

On entend par hybridation dans des conditions de stringence avec une séquence nucléotidique selon l'invention, une hybridation dans des conditions de température et de force ionique choisies de telle manière qu'elles permettent le maintien de l'hybridation entre deux fragments d'ADN complémentaires.

A titre illustratif, des conditions de forte stringence de l'étape d'hybridation aux fins de définir les fragments nucléotidiques décrits ci-dessus, sont avantageusement les suivantes.

L'hybridation est réalisée à une température préférentielle de 65°C en présence de tampon SSC; 1 x SSC correspondant à 0,15 M NaCl et 0,05 M citrate de Na. Les étapes de lavage peuvent, par exemple, être les suivantes :

- 2 x SSC, à température ambiante suivi de 2 lavages à 2 x SSC, 0,5 % SDS à 65°C ; 2 x 0,5 x SSC, 0,5 % SDS ; à 65°C pendant 10 minutes chacun.

5 Les conditions de stringence intermédiaire, en utilisant par exemple une température de 42°C en présence d'un tampon 2 x SSC, ou de faible stringence, par exemple une température de 37°C en présence d'un tampon 2 x SSC, requièrent respectivement pour l'hybridation entre les deux séquences une complémentarité globale moins importante.

10 Les conditions stringentes d'hybridation décrites ci-avant pour un polynucléotide d'une taille d'environ 350 bases, seront adaptées par l'homme du métier pour des oligonucléotides de taille plus grande ou plus petite, selon l'enseignement de Sambrook et al., 1989.

15 Parmi les séquences nucléotidiques selon l'invention, on préfère également celles utilisables comme amorce ou sonde dans des méthodes permettant d'obtenir les séquences homologues selon l'invention, ces méthodes telles que la réaction en chaîne à la polymérase (PCR), le clonage et le 20 séquençage d'acide nucléique étant bien connues de l'homme de l'art.

25 Parmi lesdites séquences nucléotidiques selon l'invention, on préfère encore celles utilisables comme amorce ou sonde dans des méthodes permettant de diagnostiquer la présence de circovirus MAP ou l'un de ses variants telles que définies ci-après.

On préfère également les séquences nucléotidiques selon l'invention capables de moduler, d'inhiber ou 30 d'induire l'expression de gène du circovirus MAP ou l'un de ses variants, et/ou capables de moduler le cycle de réPLICATION du circovirus MAP ou l'un de ses variants dans la cellule et/ou l'organisme hôte. On entendra désigner par cycle de réPLICATION, l'invasion, la multiplication du circovirus MAP ou l'un de ses variants, et sa propagation 35 cellules hôtes à cellules hôtes dans l'organisme hôte.

Parmi lesdites séquences nucléotidiques selon l'invention, on préfère enfin celles correspondant à des

cadres ouverts de lecture, dénommés séquences ORF (ORF pour "open reading frame"), et codant pour des polypeptides, telles que par exemple les séquences ORF1, ORF2 et ORF3 correspondant respectivement aux séquences nucléotidiques comprises entre les positions 47 à 985 (ORF1), les positions 1022 à 1723 (ORF2) et les positions 38 à 658 (ORF3), les extrémités étant comprises, les positions étant déterminées par rapport à la position des nucléotides sur la séquence SEQ ID N° 1 représentée à la figure 2.

Les fragments de séquence nucléotidique selon l'invention peuvent être obtenus par exemple par amplification spécifique, telle que la PCR, ou après digestion par des enzymes de restriction appropriées de séquences nucléotidiques selon l'invention, ces méthodes sont en particulier décrites dans l'ouvrage de Sambrook et al., 1989. Cesdits fragments représentatifs peuvent également être obtenus par synthèse chimique lorsque leur taille n'est pas trop importante et selon des méthodes bien connues de l'homme de l'art.

Par séquence nucléotidique modifiée, on entendra toute séquence nucléotidique obtenue par mutagenèse selon des techniques bien connues de l'homme de l'art, et comportant des modifications par rapport aux séquences normales selon l'invention, par exemple des mutations dans les séquences régulatrices et/ou promotrices de l'expression de polypeptide, notamment conduisant à une modification du taux d'expression dudit polypeptide ou à une modulation du cycle répliquatif.

Par séquence nucléotidique modifiée, on entendra également toute séquence nucléotidique codant pour un polypeptide modifié tel que défini ci-après.

La présente invention a pour objet des séquences nucléotidiques de circovirus MAP selon l'invention, caractérisées en ce qu'elles sont choisies parmi les séquences ORF1, ORF2 et ORF3 et telles que définies précédemment.

L'invention concerne également les séquences nucléotidiques caractérisées en ce qu'elles comprennent une séquence nucléotidique choisie parmi :

- 5 a) une séquence nucléotidique ORF1 à ORF3 selon l'invention ;
- b) une séquence nucléotidique de fragment spécifique d'une séquence ORF1 à ORF3 selon l'invention ou d'une séquence telle que définie en a) ;
- 10 c) une séquence nucléotidique homologue comportant au moins 80 % d'identité avec une séquence nucléotidique ORF1 à ORF3 selon l'invention ou telle que définie en a) ou b) ;
- d) une séquence nucléotidique complémentaire ou d'ARN correspondant à une séquence ORF1 à ORF3 selon 15 l'invention ou telle que définie en a), b) ou c) ; et
- e) une séquence nucléotidique modifiée d'une séquence ORF1 à ORF3 selon l'invention ou telle que définie en a), b), c), ou d).

En ce qui concerne l'homologie avec les séquences nucléotidiques ORF1 à ORF3, on préfère les séquences homologues spécifiques telles que définies précédemment présentant un pourcentage d'identité avec les bases de l'une des séquences nucléotidiques ORF1 à ORF3 d'au moins 80 %, de préférence 90 % et 95 %. Lesdites séquences homologues spécifiques peuvent comprendre, par exemple, les séquences correspondant aux séquences ORF1 à ORF3 de variant du circovirus MAP. Ces séquences homologues spécifiques peuvent de la même manière correspondre à des variations liées à des mutations au sein de la souche de circovirus MAP et correspondre notamment à des troncatures, substitutions, délétions et/ou additions d'au moins un nucléotide.

De manière préférée, l'invention est relative aux séquences nucléotidiques selon l'invention, caractérisées en ce qu'elles comprennent une séquence nucléotidique choisie parmi les séquences suivantes :

- a) 170 5' TGTGGCGA 3' ;
- b) 450 5' AGTTTCCT 3' ;
- c) 1026 5' TCATTTAGAGGGTCTTCCAG 3' ;
- d) 1074 5' GTCAAACCT 3' ;
- 5 e) 1101 5' GTGGTTGC 3' ;
- f) 1123 5' AGCCCAGG 3' ;
- g) 1192 5' TTGGCTGG 3' ;
- h) 1218 5' TCTAGCTCTGGT 3' ;
- i) 1501 5' ATCTCAGCTCGT 3' ;
- 10 j) 1536 5' TGTCCTCCTCTT 3' ;
- k) 1563 5' TCTCTAGA 3' ;
- l) 1632 5' TGTACCAA 3' ;
- m) 1686 5' TCCGTCTT 3' ; et leur séquence complémentaire.

Dans la liste des séquences nucléotidiques a)-m) ci-dessus, les nucléotides soulignés sont mutés par rapport aux deux séquences connues de circovirus non pathogènes pour le porc. Le nombre précédent la séquence nucléotidique représente la position du premier nucléotide de ladite séquence sur la séquence SEQ ID N° 1.

L'invention comprend les polypeptides codés par une séquence nucléotidique selon l'invention, de préférence un polypeptide dont la séquence est représentée par un fragment spécifique d'une des 6 séquences d'acides aminés représentées à la figure 3, ces 6 séquences d'acides aminés correspondant aux polypeptides pouvant être codés suivant l'un des 3 cadres de lecture possibles de la séquence SEQ ID N° 1 ou de la séquence d'ADN de son brin complémentaire.

L'invention concerne également les polypeptides caractérisés en ce qu'ils comprennent un polypeptide choisi parmi les séquences d'acides aminés SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3 et SEQ ID N° 4, représentées respectivement sur les figures 4, 5 et 6.

L'invention concerne aussi les polypeptides caractérisés en ce qu'ils comprennent un polypeptide choisi parmi :

- a) un polypeptide selon l'invention ;

- b) un fragment spécifique d'au moins 5 acides aminés d'un polypeptide selon l'invention et tel que défini en a) ;
- c) un polypeptide homologue à un polypeptide selon l'invention, ou tel que défini en a) ou b) ;
- 5 d) un fragment spécifique biologiquement actif d'un polypeptide selon l'invention, ou tel que défini en a), b) ou c) ; et
- e) un polypeptide modifié d'un polypeptide selon l'invention, ou tel que défini en a), b), c) ou d).

10 Dans la présente description, les termes polypeptide, peptide et protéine sont interchangeables.

Il doit être compris que l'invention ne concerne pas les polypeptides sous forme naturelle, c'est-à-dire qu'ils ne sont pas pris dans leur environnement naturel mais 15 qu'ils ont pu être isolés ou obtenus par purification à partir de sources naturelles, ou bien obtenus par recombinaison génétique, ou encore par synthèse chimique et qu'ils peuvent alors comporter des acides aminés non naturels, comme cela sera décrit ci-après.

20 Par fragment de polypeptide selon l'invention, on entend désigner un polypeptide comportant au minimum 5 acides aminés, de préférence 10 acides aminés et 15 acides aminés.

25 Par fragment spécifique de polypeptide, on entend désigner dans la présente invention un fragment de polypeptide codé par une séquence nucléotidique de fragment spécifique selon l'invention.

Par polypeptide-homologue, on entendra désigner les polypeptides présentant un fragment spécifique de polypeptide selon l'invention, et présentant, par rapport au polypeptide naturel, certaines modifications comme en particulier une délétion, addition ou substitution d'au moins un acide aminé, une troncation, un allongement, une fusion chimérique, et/ou une mutation. Parmi les 30 polypeptides homologues "spécifiques", on préfère ceux dont la séquence d'acides aminés présente au moins 80 %, de préférence 90 %, d'homologie avec les séquences d'acides 35

aminés des polypeptides selon l'invention. Dans le cas d'une substitution, un ou plusieurs acides aminés consécutifs ou non consécutifs, sont remplacés par des acides aminés "équivalents". L'expression acide aminé "équivalent" vise ici à désigner tout acide aminé susceptible d'être substitué à l'un des acides aminés de la structure de base sans cependant modifier essentiellement les activités biologiques des peptides correspondants et telles qu'elles seront définies par la suite.

Ces acides aminés équivalents peuvent être déterminés soit en s'appuyant sur leur homologie de structure avec les acides aminés auxquels ils se substituent, soit sur des résultats d'essais comparatifs d'activité biologique entre les différents polypeptides susceptibles d'être effectués.

A titre d'exemple, on mentionnera les possibilités de substitutions susceptibles d'être effectuées sans qu'il en résulte une modification approfondie de l'activité biologique des polypeptides modifiés correspondants, les remplacements, par exemple, de la leucine par la valine ou l'isoleucine, de l'acide aspartique par l'acide glutamique, de la glutamine par l'asparagine, de l'arginine par la lysine etc., les substitutions inverses étant naturellement envisageables dans les mêmes conditions.

Les polypeptides homologues spécifiques correspondent également aux polypeptides codés par les séquences nucléotidiques homologues spécifiques telles que définies précédemment et comprennent ainsi dans la présente définition les polypeptides mutés ou correspondant à des variants, pouvant exister chez circovirus MAP, et qui correspondent notamment à des troncatures, substitutions, délétions et/ou additions d'au moins un résidu d'acide aminé.

Par fragment spécifique biologiquement actif d'un polypeptide selon l'invention, on entendra désigner en particulier un fragment spécifique de polypeptide, tel que défini ci-dessus, présentant au moins une des

caractéristiques des polypeptides selon l'invention, notamment en ce qu'il est :

- capable d'induire une réaction d'immunogénicité dirigée contre le circovirus MAP ; et/ou
- 5 - capable d'être reconnu par un anticorps spécifique d'un polypeptide selon l'invention ; et/ou
- capable de se lier à un polypeptide ou à une séquence nucléotidique de circovirus MAP ; et/ou
- 10 - capable d'exercer une activité physiologique, même partielle, telle que par exemple une activité de dissémination ou structurelle (capside) ; et/ou
- capable de moduler, d'induire ou d'inhiber l'expression de gène de circovirus MAP ou l'un de ses variants, et/ou capable de moduler le cycle de réPLICATION de circovirus
- 15 MAP ou l'un de ses variants dans la cellule et/ou l'organisme hôte.

Les fragments de polypeptide selon l'invention peuvent correspondre à des fragments isolés ou purifiés naturellement présents dans le circovirus MAP ou 20 correspondre à des fragments pouvant être obtenus par clivage dudit polypeptide par une enzyme protéolytique, telle que la trypsine ou la chymotrypsine ou la collagénase, ou par un réactif chimique, tel que le bromure de cyanogène (CNBr) ou encore en plaçant ledit polypeptide 25 dans un environnement très acide, par exemple à pH 2,5. De tels fragments polypeptidiques peuvent être également préparés indifféremment par synthèse chimique, à partir d'hôtes transformés par un vecteur d'expression selon l'invention contenant un acide nucléique permettant 30 l'expression desdits fragments, placé sous le contrôle des éléments de régulation et/ou d'expression appropriés.

Par "polypeptide modifié" d'un polypeptide selon l'invention, on entend désigner un polypeptide obtenu par recombinaison génétique ou par synthèse chimique comme cela sera décrit ci-après, présentant au moins une modification par rapport à la séquence normale. Ces modifications pourront notamment porter sur des acides aminés à l'origine

d'une spécificité, de la pathogénicité et/ou de virulence, ou à l'origine de la conformation structurale, et de la capacité d'insertion membranaire du polypeptide selon l'invention. On pourra ainsi créer des polypeptides 5 d'activité équivalente, augmentée ou diminuée, et de spécificité équivalente, plus étroite, ou plus large. Parmi les polypeptides modifiés, il faut citer les polypeptides dans lesquels jusqu'à 5 acides aminés peuvent être modifiés, tronqués à l'extrémité N- ou C-terminale, ou bien 10 déletés, ou bien ajoutés.

Comme cela est indiqué, les modifications du polypeptide auront pour objectif notamment :

- de le rendre capable de moduler, d'inhiber ou d'induire l'expression de gène de circovirus MAP et/ou l'un de ses variants et/ou capable de moduler le cycle de réPLICATION de circovirus MAP et/ou l'un de ses variants dans la cellule et/ou l'organisme hôte,
- de permettre son incorporation dans des compositions vaccinales,
- 20 - de modifier sa biodisponibilité en tant que composé à usage thérapeutique.

Les méthodes permettant de mettre en évidence lesdites modulations sur des cellules eucaryotes ou procaryotes sont bien connues de l'homme de l'art. Il est également bien 25 entendu que les séquences nucléotidiques codant pour lesdits polypeptides modifiés pourront être utilisées pour lesdites modulations, par exemple par l'intermédiaire de vecteurs selon l'invention et décrits ci-après, afin, par exemple, de prévenir ou de traiter les pathologies liées à 30 l'infection.

Les polypeptides modifiés précédents peuvent être obtenus en utilisant la chimie combinatoire, dans laquelle il est possible de faire varier systématiquement des parties de polypeptide avant de les tester sur des modèles, 35 cultures cellulaires ou des micro-organismes par exemple, pour sélectionner les composés les plus actifs ou présentant les propriétés recherchées.

La synthèse chimique présente également l'avantage de pouvoir utiliser :

- des acides aminés non naturels, ou
- des liaisons non peptidiques.

5 Ainsi, afin d'améliorer la durée de vie des polypeptides selon l'invention, il pourra être intéressant d'utiliser des acides aminés non naturels, par exemple sous forme D, ou bien des analogues d'acides aminés, notamment des formes soufrées par exemple.

10 Enfin, la structure des polypeptides selon l'invention, ses formes homologues spécifiques ou modifiées, pourra être intégrée dans des structures chimiques de type polypeptidique ou autres. Ainsi, il pourra être intéressant de prévoir aux extrémités N- et C- 15 terminales des composés non reconnus par les protéases.

Font également partie de l'invention les séquences nucléotidiques codant pour un polypeptide selon l'invention.

20 L'invention concerne également des séquences nucléotidiques utilisables comme amorce ou sonde, caractérisées en ce que lesdites séquences sont choisies parmi les séquences nucléotidiques selon l'invention.

Parmi les couples de séquences nucléotidiques utilisables comme couple d'amorces selon l'invention, on 25 préfère les couples d'amorces choisis parmi les couples suivants :

- a) 5' GTG TGC TCG ACA TTG GTG TG 3', et
5' TGG AAT GTT AAC GAG CTG AG 3';
- b) 5' GTG TGC TCG ACA TTG GTG TG 3', et
30 5' CTC GCA GCC ATC TTG GAA TG 3' ;
- c) 5' CGC GCG TAA TAC GAC TCA CT 3', et
5' GTG TGC TCG ACA TTG GTG TG 3' ;
- d) 5' CGC GCG TAA TAC GAC TCA CT 3', et
5' CTC GCA GCC ATC TTG GAA TG 3' .

35

Le clonage et le séquençage du circovirus MAP a permis d'identifier, après analyse comparative avec les séquences

nucléotidiques des autres circovirus porcins, quelles étaient parmi les séquences de fragments de ces acides nucléiques, celles qui sont strictement spécifiques du circovirus MAP et celles qui correspondent à une séquence consensus de circovirus porcins autres de lignées cellulaires.

Un grand besoin existe également de pouvoir disposer de séquences nucléotidiques utilisables comme amorce ou sonde spécifiques de l'ensemble de circovirus porcins autres connus et non pathogènes.

Cesdites séquences nucléotidiques consensus spécifiques de l'ensemble de circovirus, autres que circovirus MAP, sont facilement identifiables sur la figure 3, et font partie de l'invention.

Parmi cesdites séquences nucléotidiques consensus, on préfère celle caractérisée en ce qu'elle fait partie du couple d'amorces suivant :

- a) 5' GTG TGC TCG ACA TTG GTG TG 3', et
5' TGG AAT GTT AAC TAC CTC AA 3'.

Il est bien entendu que la présente invention a également pour objet les polypeptides spécifiques de circovirus porcins connus autres que circovirus MAP, codés par lesdites séquences nucléotidiques consensus, susceptibles d'être obtenus par purification à partir des polypeptides naturels, par recombinaison génétique ou par synthèse chimique par des procédés bien connus de l'homme de l'art et tels que décrits notamment ci-après. De la même manière, les anticorps mono ou polyclonaux, marqués ou non marqués dirigés contre lesdits polypeptides spécifiques codés par lesdites séquences nucléotidiques consensus, font aussi partie de l'invention.

Lesdites séquences nucléotidiques consensus, lesdits polypeptides correspondants ainsi que lesdits anticorps dirigés contre lesdits polypeptides, pourront être utilisés dans des procédés ou nécessaires de détection et/ou d'identification tels que décrits ci-après, à la place ou en outre des séquences nucléotidiques, des polypeptides ou

des anticorps selon l'invention, spécifiques du circovirus MAP.

Ces protocoles ont été améliorés pour détecter de façon différentielle les formes monomériques circulaires de 5 formes réplicatives spécifiques du virion ou de l'ADN en réplication et les formes dimériques retrouvées dans les constructions moléculaires dites en tandem.

L'invention concerne en outre l'utilisation d'une séquence nucléotidique selon l'invention, comme amorce ou 10 sonde, pour la détection et/ou l'amplification de séquences d'acide nucléique.

Les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent ainsi être utilisées pour amplifier des séquences nucléotidiques, notamment par la technique PCR (réaction en 15 chaîne à la polymérase) (Erlich, 1989 ; Innis et al., 1990 ; Rolfs et al., 1991 ; et White et al., 1997).

Ces amorces oligodésoxyribonucléotidiques ou oligo-ribonucléotidiques ont avantageusement une longueur d'au moins 8 nucléotides, de préférence d'au moins 12 20 nucléotides, et encore plus préférentiellement au moins 20 nucléotides.

D'autres techniques d'amplification de l'acide nucléique cible peuvent être avantageusement employées comme alternatives à la PCR.

25 Les séquences nucléotidiques de l'invention, en particulier les amorces selon l'invention, peuvent également être mises en oeuvre dans d'autres procédés d'amplification d'un acide nucléique cible, tels que :

- la technique TAS (Transcription-based Amplification System), décrite par Kwoh et al. en 1989 ;
- la technique 3SR (Self-Sustained Sequence Replication), décrite par Guatelli et al. en 1990 ;
- la technique NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification), décrite par Kievitis et al. en 1991 ;
- 35 - la technique SDA (Strand Displacement Amplification) ou technique d'amplification à déplacement de brin (Walker et al., 1992) ;

- la technique TMA (Transcription Mediated Amplification).

Les polynucléotides de l'invention peuvent aussi être employés dans des techniques d'amplification ou de modification de l'acide nucléique servant de sonde, telles que :

- la technique LCR (Ligase Chain Reaction), décrite par Landegren et al. en 1988 et perfectionnée par Barany et al. en 1991, qui emploie une ligase thermostable ;
- la technique de RCR (Repair Chain Reaction), décrite par Segev en 1992 ;
- la technique CPR (Cycling Probe Reaction), décrite par Duck et al. en 1990 ;
- la technique d'amplification à la Q-beta-réplicase, décrite par Miele et al. en 1983 et perfectionnée notamment par Chu et al. en 1986, Lizardi et al. en 1988, puis par Burg et al. ainsi que par Stone et al. en 1996.

Dans le cas où éventuellement le polynucléotide cible à détecter est un ARN, par exemple un ARNm, on pourra utiliser, préalablement à la mise en oeuvre d'une réaction d'amplification à l'aide d'au moins une amorce selon l'invention ou à la mise en oeuvre d'un procédé de détection à l'aide d'au moins une sonde de l'invention, une enzyme de type transcriptase inverse afin d'obtenir un ADNc à partir de l'ARN contenu dans l'échantillon biologique. L'ADNc obtenu servira alors de cible pour la ou les amorces ou la ou les sondes mises en oeuvre dans le procédé d'amplification ou de détection selon l'invention.

La sonde de détection sera choisie de telle manière à ce qu'elle hybride avec la séquence cible ou l'amplicon généré à partir de la séquence cible. Une telle sonde de détection aura avantageusement pour séquence une séquence d'au moins 12 nucléotides, en particulier d'au moins 20 nucléotides, et de préférence d'au moins 100 nucléotides.

L'invention comprend aussi les séquences nucléotidiques utilisables comme sonde ou amorce selon l'invention, caractérisées en ce qu'elles sont marquées par un composé radioactif ou par un composé non radioactif.

Les séquences nucléotidiq[ue]s non marquées peuvent être utilisées directement comme sondes ou amorces, cependant les séquences sont généralement marquées par un élément radioactif (^{32}P , ^{35}S , ^3H , ^{125}I) ou par une molécule non radioactive (biotine, acétylaminofluorène, digoxigénine, 5-bromo-désoxyuridine, fluorescéine) pour obtenir des sondes utilisables pour de nombreuses applications.

Des exemples de marquage non radioactifs de séquences nucléotidiq[ue]s sont décrits, par exemple, dans le brevet français N° 78.10975 ou par Urdea et al. ou par Sanchez-Pescador et al. en 1988.

Dans ce dernier cas, on pourra aussi utiliser l'une des méthodes de marquage décrites dans les brevets FR-2 422 956 et FR-2 518 755.

La technique d'hybridation peut être réalisée de manières diverses (Matthews et al., 1988). La méthode la plus générale consiste à immobiliser l'acide nucléique extrait des cellules sur un support (tel que nitrocellulose, nylon, polystyrène) et à incuber, dans des conditions bien définies, l'acide nucléique cible immobilisé avec la sonde. Après l'hybridation, l'excès de sonde est éliminé et les molécules hybrides formées sont détectées par la méthode appropriée (mesure de la radioactivité, de la fluorescence ou de l'activité enzymatique liée à la sonde).

L'invention comprend également les séquences nucléotidiq[ue]s selon l'invention, caractérisées en ce qu'elles sont immobilisées sur un support, de manière covalente ou non covalente.

Selon un autre mode avantageux de mise en oeuvre des séquences nucléotidiq[ue]s selon l'invention, ces dernières peuvent être utilisées immobilisées sur un support et servir ainsi à capturer par hybridation spécifique l'acide nucléique cible obtenu à partir de l'échantillon biologique à tester. Si nécessaire, le support solide est séparé de l'échantillon et le complexe d'hybridation formé entre la sonde dite de capture et l'acide nucléique cible est

ensuite détecté grâce à une seconde sonde, dite sonde de détection, marquée par un élément facilement détectable.

Un autre objet de la présente invention est un vecteur pour le clonage et/ou l'expression d'une séquence, 5 caractérisé en ce qu'il contient une séquence nucléotidique selon l'invention.

Les vecteurs selon l'invention, caractérisés en ce qu'ils comportent les éléments permettant l'expression et/ou la sécrétion desdites séquences nucléotidiques dans 10 une cellule hôte déterminée, font également partie de l'invention.

Le vecteur doit alors comporter un promoteur, des signaux d'initiation et de terminaison de la traduction, ainsi que des régions appropriées de régulation de la 15 transcription. Il doit pouvoir être maintenu de façon stable dans la cellule hôte et peut éventuellement posséder des signaux particuliers spécifiant la sécrétion de la protéine traduite. Ces différents éléments sont choisis en fonction de l'hôte cellulaire utilisé. A cet effet, les 20 séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent être insérées dans des vecteurs à réPLICATION autonome au sein de l'hôte choisi, ou des vecteurs intégratifs de l'hôte choisi.

De tels vecteurs seront préparés selon les méthodes 25 couramment utilisées par l'homme du métier, et les clones en résultant pourront être introduits dans un hôte approprié par des méthodes standard, telles que par exemple la lipofection, l'électroporation, le choc thermique.

Les vecteurs selon l'invention sont par exemple des 30 vecteurs d'origine plasmidique ou virale.

Un vecteur préféré pour l'expression des polypeptides de l'invention est le baculovirus.

On préfère également le vecteur pBS KS dans lequel est 35 inséré la séquence d'ADN en tandem du circovirus MAP (ou DFP) et tel que déposé à la CNCM le 3 juillet 1997, sous le numéro I-1891.

Ces vecteurs sont utiles pour transformer des cellules hôtes afin de cloner ou d'exprimer les séquences nucléotidiques de l'invention.

5 L'invention comprend également les cellules hôtes transformées par un vecteur selon l'invention.

10 Ces cellules peuvent être obtenues par l'introduction dans des cellules hôtes d'une séquence nucléotidique insérée dans un vecteur tel que défini ci-dessus, puis la mise en culture desdites cellules dans des conditions permettant la réPLICATION et/ou l'expression de la séquence nucléotidique transfectée.

15 L'hôte cellulaire peut être choisi parmi des systèmes procaryotes ou eucaryotes, comme par exemple les cellules bactériennes (Olins et Lee, 1993), mais également les cellules de levure (Buckholz, 1993), de même que les cellules animales, en particulier les cultures de cellules de mammifères (Edwards et Aruffo, 1993), et notamment les cellules d'ovaire de hamster chinois (CHO), mais également les cellules d'insectes dans lesquelles on peut utiliser 20 des procédés mettant en oeuvre des baculovirus par exemple (Luckow, 1993).

Une cellule hôte préférée pour l'expression des protéines de l'invention est constituée par les cellules d'insectes sf9.

25 Une cellule hôte encore préférée selon l'invention est E-coli, telle que déposée à la CNCM le 3 juillet 1997, sous le numéro I-1891.

30 L'invention concerne également les animaux, comprenant une desdites cellules transformées selon l'invention.

35 L'obtention d'animaux transgéniques selon l'invention surexprimant un ou plusieurs des gènes de circovirus MAP ou partie de gènes sera menée de façon préférée sur des rats, des souris ou des lapins selon des méthodes bien connues de l'homme de l'art telles que par transfections, virales ou non virales. Les animaux transgéniques surexprimant l'un ou plusieurs desdits gènes pourront être obtenus par

transfection de copies multiples desdits gènes sous contrôle d'un promoteur puissant de nature ubiquitaire, ou sélectif d'un type de tissu. Les animaux transgéniques pourront également obtenus par recombinaison homologue sur cellules souches embryonnaires, transfert de ces cellules souches à des embryons, sélection des chimères affectées au niveau des lignées reproductrices, et croissance desdites chimères.

Les cellules transformées ainsi que les animaux transgéniques selon l'invention sont utilisables dans des procédés de préparation de polypeptide recombinant.

Il est aujourd'hui possible de produire des polypeptides recombinants en quantité relativement importante par génie génétique en utilisant les cellules transformées par des vecteurs d'expression selon l'invention ou en utilisant des animaux transgéniques selon l'invention.

Les procédés de préparation d'un polypeptide de l'invention sous forme recombinante, caractérisés en ce qu'ils mettent en oeuvre un vecteur et/ou une cellule transformée par un vecteur selon l'invention et/ou un animal transgénique comprenant une desdites cellules transformées selon l'invention, sont eux-mêmes compris dans la présente invention.

Parmi lesdits procédés de préparation d'un polypeptide de l'invention sous forme recombinante, on préfère les procédés de préparation mettant en oeuvre un vecteur, et/ou une cellule transformée par ledit vecteur et/ou un animal transgénique comprenant une desdites cellules transformées, contenant une séquence nucléotidique selon l'invention codant pour un polypeptide de circovirus MAP.

Les polypeptides recombinants obtenus comme indiqué ci-dessus, peuvent aussi bien se présenter sous forme glycosylée que non glycosylée et peuvent présenter ou non la structure tertiaire naturelle.

Une variante préférée consiste à produire un polypeptide recombinant fusionné à une protéine "porteuse" (protéine chimère). L'avantage de ce système est qu'il permet une stabilisation et une diminution de la protéolyse du produit recombinant, une augmentation de la solubilité au cours de la renaturation *in vitro* et/ou une simplification de la purification lorsque le partenaire de fusion possède une affinité pour un ligand spécifique.

Plus particulièrement, l'invention concerne un procédé de préparation d'un polypeptide de l'invention comprenant les étapes suivantes :

- 5 a) culture des cellules transformées dans des conditions permettant l'expression d'un polypeptide recombinant de séquence nucléotidique selon l'invention ;
- 10 b) le cas échéant, récupération dudit polypeptide recombinant.

Lorsque le procédé de préparation d'un polypeptide de l'invention met en oeuvre un animal transgénique selon l'invention, le polypeptide recombinant est ensuite extrait 20 dudit animal.

L'invention a aussi pour objet un polypeptide susceptible d'être obtenu par un procédé de l'invention tel que décrit précédemment.

L'invention comprend aussi un procédé de préparation 25 d'un polypeptide synthétique, caractérisé en ce qu'il utilise une séquence d'acides aminés de polypeptides selon l'invention.

L'invention concerne également un polypeptide synthétique obtenu par un procédé selon l'invention.

30 Les polypeptides selon l'invention peuvent également être préparés par les techniques classiques, dans le domaine de la synthèse des peptides. Cette synthèse peut être réalisée en solution homogène ou en phase solide.

Par exemple, on aura recours à la technique de 35 synthèse en solution homogène décrite par Houbenweyl en 1974.

Cette méthode de synthèse consiste à condenser successivement deux-à-deux les acides aminés successifs dans l'ordre requis, ou à condenser des acides aminés et des fragments préalablement formés et contenant déjà plusieurs acides aminés dans l'ordre approprié, ou encore plusieurs fragments préalablement ainsi préparés, étant entendu que l'on aura eu soin de protéger au préalable toutes les fonctions réactives portées par ces acides aminés ou fragments, à l'exception des fonctions amines de l'un et carboxyles de l'autre ou vice-versa, qui doivent normalement intervenir dans la formation des liaisons peptidiques, notamment après activation de la fonction carboxyle, selon les méthodes bien connues dans la synthèse des peptides.

Selon une autre technique préférée de l'invention, on a recours à celle décrite par Merrifield.

Pour fabriquer une chaîne peptidique selon le procédé de Merrifield, on a recours à une résine polymère très poreuse, sur laquelle on fixe le premier acide aminé C-terminal de la chaîne. Cet acide aminé est fixé sur une résine par l'intermédiaire de son groupe carboxylique et sa fonction amine est protégée. On fixe ainsi, les uns après les autres, les acides aminés qui vont constituer la chaîne peptidique sur le groupe amine chaque fois déprotégé au préalable de la portion de la chaîne peptidique déjà formée, et qui est rattachée à la résine. Lorsque la totalité de la chaîne peptidique désirée est formée, on élimine les groupes protecteurs des différents acides aminés constituant la chaîne peptidique et on détache le peptide de la résine à l'aide d'un acide.

L'invention est en outre relative à des polypeptides hybrides présentant au moins un polypeptide selon l'invention, et une séquence d'un polypeptide susceptible d'induire une réponse immunitaire chez l'homme ou l'animal.

Avantageusement, le déterminant antigénique est tel qu'il est susceptible d'induire une réponse humorale et/ou cellulaire.

Un tel déterminant pourra comprendre un polypeptide selon l'invention sous forme glycosylée utilisé en vue d'obtenir des compositions immunogènes susceptibles d'induire la synthèse d'anticorps dirigés contre des épitopes multiples. Lesdits polypeptides ou leurs fragments glycosylés font également partie de l'invention.

Ces molécules hybrides peuvent être constituées en partie d'une molécule porteuse de polypeptides ou de leurs fragments selon l'invention, associée à une partie éventuellement immunogène, en particulier un épitope de la toxine diphtérique, la toxine tétanique, un antigène de surface du virus de l'hépatite B (brevet FR 79 21811), l'antigène VP1 du virus de la poliomyélite ou toute autre toxine ou antigène viral ou bactérien.

Les procédés de synthèse des molécules hybrides englobent les méthodes utilisées en génie génétique pour construire des séquences nucléotidiques hybrides codant pour les séquences polypeptidiques recherchées. On pourra, par exemple, se référer avantageusement à la technique d'obtention de gènes codant pour des protéines de fusion décrite par Minton en 1984.

Lesdites séquences nucléotidiques hybrides codant pour un polypeptide hybride ainsi que les polypeptides hybrides selon l'invention caractérisés en ce qu'il s'agit de polypeptides recombinants obtenus par l'expression desdites séquences nucléotidiques hybrides, font également partie de l'invention.

L'invention comprend également les vecteurs caractérisés en ce qu'ils contiennent une desdites séquences nucléotidiques hybrides. Les cellules hôtes transformées par lesdits vecteurs, les animaux transgéniques comprenant une desdites cellules transformées ainsi que les procédés de préparation de polypeptides recombinants utilisant lesdits vecteurs, lesdites cellules transformées et/ou lesdits animaux transgéniques font bien entendu également partie de l'invention.

Les polypeptides selon l'invention, les anticorps selon l'invention ci-après décrits et les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent avantageusement être mis en oeuvre dans des procédés *in vitro* et/ou *in vivo* pour la détection et/ou l'identification de circovirus MAP, ou de circovirus porcin autre que le circovirus MAP, dans un échantillon biologique (tissu ou fluide biologique) susceptible de les contenir. Ces procédés, suivant la spécificité des polypeptides, des anticorps et des séquences nucléotidiques selon l'invention qui seront utilisés, pourront en particulier détecter et/ou identifier le circovirus MAP ou le circovirus porcin autre que le circovirus MAP.

Les polypeptides selon l'invention peuvent avantageusement être mis en oeuvre dans un procédé pour la détection et/ou l'identification de Circovirus MAP ou de circovirus porcin autre que le circovirus MAP, dans un échantillon biologique (tissu ou fluide biologique) susceptible de les contenir, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) mise en contact de cet échantillon biologique avec un polypeptide ou un de ses fragments selon l'invention (dans des conditions permettant une réaction immunologique entre ledit polypeptide et les anticorps éventuellement présents dans l'échantillon biologique) ;
- b) mise en évidence des complexes antigène-anticorps éventuellement formés.

De préférence, l'échantillon biologique est constitué par un fluide, par exemple un sérum de porc, du sang total ou des biopsies.

Toute procédure classique peut être mise en oeuvre pour réaliser une telle détection des complexes antigène-anticorps éventuellement formés.

A titre d'exemple, une méthode préférée met en jeu des processus immunoenzymatiques selon la technique ELISA, par immunofluorescence, ou radio-immunologiques (RIA) ou équivalent.

Ainsi, l'invention concerne également les polypeptides selon l'invention, marqués à l'aide d'un marqueur adéquat tel que du type enzymatique, fluorescent, radioactif.

De telles méthodes comprennent par exemple les étapes suivantes :

- dépôt de quantités déterminées d'une composition polypeptidique selon l'invention dans les puits d'une plaque de microtitration,
- introduction dans lesdits puits de dilutions croissantes de sérum, ou d'échantillon biologique autre tel que défini précédemment, devant être analysé,
- incubation de la microplaqué,
- introduction dans les puits de la plaque de microtitration d'anticorps marqués dirigés contre des immunoglobulines de porc, le marquage de ces anticorps ayant été réalisé à l'aide d'une enzyme sélectionnée parmi celles qui sont capables d'hydrolyser un substrat en modifiant l'absorption des radiations de ce dernier, au moins à une longueur d'onde déterminée, par exemple à 20 550 nm,
- détection, en comparaison avec un témoin de contrôle, de la quantité de substrat hydrolysé.

L'invention concerne également un kit ou nécessaire pour la détection et/ou l'identification de circovirus MAP ou de circovirus porcin autre que le circovirus MAP, caractérisé en ce qu'il comprend les éléments suivants :

- un polypeptide selon l'invention,
- le cas échéant, les réactifs pour la constitution du milieu propice à la réaction immunologique ou spécifique,
- les réactifs permettant la détection des complexes antigène-anticorps produits par la réaction immunologique entre le ou les polypeptides de l'invention et les anticorps éventuellement présents dans l'échantillon biologique, ces réactifs pouvant également porter un marqueur, ou être susceptibles d'être reconnus à leur tour par un réactif marqué, plus

particulièrement dans le cas où le polypeptide selon l'invention n'est pas marqué,

- le cas échéant, un échantillon biologique de référence (témoin négatif) dépourvu d'anticorps reconnus par un polypeptide selon l'invention,
- le cas échéant, un échantillon biologique de référence (témoin positif) contenant une quantité prédéterminée d'anticorps reconnus par un polypeptide selon l'invention.

Les polypeptides selon l'invention permettent de préparer des anticorps monoclonaux ou polyclonaux caractérisés en ce qu'ils reconnaissent spécifiquement les polypeptides selon l'invention. Les anticorps monoclonaux pourront avantageusement être préparés à partir d'hybridomes selon la technique décrite par Kohler et Milstein en 1975. Les anticorps polyclonaux pourront être préparés, par exemple, par immunisation d'un animal, en particulier une souris, avec un polypeptide ou un ADN selon l'invention associé à un adjuvant de la réponse immunitaire, puis purification des anticorps spécifiques contenus dans le sérum des animaux immunisés sur une colonne d'affinité sur laquelle a préalablement été fixé le polypeptide ayant servi d'antigène. Les anticorps polyclonaux selon l'invention peuvent aussi être préparés par purification, sur une colonne d'affinité, sur laquelle a préalablement été immobilisé un polypeptide selon l'invention, des anticorps contenus dans le sérum de porcs infectés par le circovirus MAP.

L'invention a également pour objet des anticorps mono ou polyclonaux ou leurs fragments, ou anticorps chimériques, caractérisés en ce qu'ils sont capables de reconnaître spécifiquement un polypeptide selon l'invention.

Les anticorps de l'invention pourront également être marqués de la même manière que décrit précédemment pour les sondes nucléiques de l'invention tels qu'un marquage de type enzymatique, fluorescent ou radioactif.

L'invention vise en outre un procédé pour la détection et/ou l'identification de circovirus MAP ou de circovirus porcin autre que le circovirus MAP, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes 5 suivantes :

a) mise en contact de l'échantillon biologique (tissu ou fluide biologique) avec un anticorps mono ou polyclonal selon l'invention (dans des conditions permettant une réaction immunologique entre lesdits anticorps et les 10 polypeptides du circovirus MAP ou de circovirus porcin autre que le circovirus MAP, éventuellement présents dans l'échantillon biologique) ;

b) mise en évidence du complexe antigène-anticorps éventuellement formé.

15

Entre également dans le cadre de l'invention, un kit ou nécessaire pour la détection et/ou l'identification du circovirus MAP ou de circovirus porcin autre que le circovirus MAP, caractérisé en ce qu'il comprend les 20 éléments suivants :

- un anticorps polyclonal ou monoclonal selon l'invention, le cas échéant marqué ;
- le cas échéant, un réactif pour la constitution du milieu propice à la réalisation de la réaction 25 immunologique ;
- un réactif permettant la détection des complexes antigène-anticorps produits par la réaction immunologique, ce réactif pouvant également porter un marqueur, ou être susceptible d'être reconnu à son tour par un réactif marqué, plus particulièrement dans le cas où ledit anticorps monoclonal ou polyclonal n'est pas marqué ;
- le cas échéant, des réactifs pour effectuer la lyse des cellules de l'échantillon testé.

35

La présente invention a également pour objet un procédé pour la détection et/ou l'identification du

circovirus MAP ou de circovirus porcin autre que le circovirus MAP, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il met en oeuvre une séquence nucléotidique selon l'invention.

5 Plus particulièrement, l'invention concerne un procédé pour la détection et/ou l'identification du circovirus MAP ou de circovirus porcin autre que le circovirus MAP, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes :

10 a) le cas échéant, isolement de l'ADN à partir de l'échantillon biologique à analyser ;
b) amplification spécifique de l'ADN de l'échantillon à l'aide d'au moins une amorce, ou un couple d'amorces, selon l'invention ;
15 c) mise en évidence des produits d'amplification.

Ceux-ci peuvent être détectés par exemple par la technique d'hybridation moléculaire en utilisant une sonde nucléique selon l'invention. Cette sonde sera avantageusement marquée par un élément non radioactif (sonde froide) 20 ou radioactif.

Aux fins de la présente invention, on entendra par "ADN de l'échantillon biologique" ou "ADN contenu dans l'échantillon biologique", soit l'ADN présent dans l'échantillon biologique considéré, soit éventuellement 25 l'ADNc obtenu après l'action d'une enzyme de type transcriptase inverse sur l'ARN présent dans ledit échantillon biologique.

Un autre but de la présente invention consiste en un procédé selon l'invention, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

30 a) mise en contact d'une sonde nucléotidique selon l'invention avec un échantillon biologique, l'ADN contenu dans l'échantillon biologique ayant, le cas échéant, préalablement été rendu accessible à l'hybridation, dans des conditions permettant l'hybridation de la sonde à l'ADN de l'échantillon ;

b) mise en évidence de l'hybride formé entre la sonde nucléotidique et l'ADN de l'échantillon biologique.

La présente invention concerne aussi un procédé selon l'invention, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) mise en contact d'une sonde nucléotidique immobilisée sur un support selon l'invention avec un échantillon biologique, l'ADN de l'échantillon ayant, le cas échéant, été préalablement rendu accessible à l'hybridation, dans des conditions permettant l'hybridation de la sonde à l'ADN de l'échantillon ;
- b) mise en contact de l'hybride formé entre la sonde nucléotidique immobilisée sur un support et l'ADN contenu dans l'échantillon biologique, le cas échéant après élimination de l'ADN de l'échantillon biologique n'ayant pas hybridé avec la sonde, avec une sonde nucléotidique marquée selon l'invention ;
- c) mise en évidence du nouvel hybride formé à l'étape b).

Selon un mode de réalisation avantageux du procédé pour la détection et/ou l'identification défini précédemment, celui-ci est caractérisé en ce que, préalablement à l'étape a), l'ADN de l'échantillon biologique est préalablement amplifié à l'aide d'au moins une amorce selon l'invention.

L'invention vise en outre un kit ou nécessaire pour la détection et/ou l'identification du circovirus MAP ou de circovirus porcin autre que le circovirus MAP, caractérisé en ce qu'il comprend les éléments suivants :

- a) une sonde nucléotidique selon l'invention ;
- b) le cas échéant, les réactifs nécessaires à la mise en œuvre d'une réaction d'hybridation ;
- c) le cas échéant, au moins une amorce selon l'invention ainsi que les réactifs nécessaires à une réaction d'amplification de l'ADN.

L'invention concerne également un kit ou nécessaire pour la détection et/ou l'identification du circovirus MAP

ou de circovirus porcin autre que le circovirus MAP, caractérisé en ce qu'il comprend les éléments suivants :

- a) une sonde nucléotidique, dite sonde de capture, selon l'invention ;
- 5 b) une sonde oligonucléotidique, dite sonde de révélation, selon l'invention ;
- c) le cas échéant, au moins une amorce selon l'invention ainsi que les réactifs nécessaires à une réaction d'amplification de l'ADN.

10 L'invention est relative aussi à un kit ou nécessaire pour la détection et/ou l'identification du circovirus MAP ou de circovirus porcin autre que le circovirus MAP, caractérisé en ce qu'il comprend les éléments suivants :

- a) au moins une amorce selon l'invention ;
- 15 b) le cas échéant, les réactifs nécessaires pour effectuer une réaction d'amplification d'ADN ;
- c) le cas échéant, un composant permettant de vérifier la séquence du fragment amplifié, plus particulièrement une sonde oligonucléotidique selon l'invention.

20 L'invention concerne en outre l'utilisation d'une séquence nucléotidique selon l'invention, d'un polypeptide selon l'invention, d'un anticorps selon l'invention, d'une cellule selon l'invention, et/ou d'un animal transformé selon l'invention, pour la sélection de composé organique ou inorganique capable de moduler, d'induire ou d'inhiber l'expression de gènes, et/ou de modifier la réplication cellulaire de circovirus MAP ou capable d'induire ou d'inhiber les pathologies liées à une infection par le circovirus MAP.

30 L'invention comprend également une méthode de sélection de composés capables de se lier à un polypeptide ou un de ses fragments selon l'invention, capables de se lier à une séquence nucléotidique selon l'invention, ou capables de reconnaître un anticorps selon l'invention, et/ou capables de moduler, d'induire ou d'inhiber l'expression de gènes, et/ou de modifier la réplication cellulaire de circovirus MAP ou capables d'induire ou

d'inhiber les pathologies liées à une infection par le circovirus MAP, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

- a) mise en contact dudit composé avec ledit polypeptide,
5 ladite séquence nucléotidique, avec une cellule transformée selon l'invention et/ou administration dudit composé à un animal transformé selon l'invention ;
- b) détermination de la capacité dudit composé à se lier
10 avec ledit polypeptide ou ladite séquence nucléotidique, ou de moduler, d'induire ou d'inhiber l'expression de gènes, ou de moduler la croissance ou la réPLICATION ou du circovirus MAP, ou d'induire ou d'inhiber chez ledit animal transformé les pathologies liées à une infection par circovirus MAP (dénommée activité dudit composé).

15

Les composés susceptibles d'être sélectionnés peuvent être des composés organiques tels que des polypeptides ou hydrates de carbone ou tous autres composés organiques ou inorganiques déjà connus, ou des composés organiques nouveaux élaborés à partir de techniques de modélisation moléculaire et obtenus par synthèse chimique ou biochimique, ces techniques étant connues de l'homme de l'art.

Lesdits composés sélectionnés pourront être utilisés pour moduler la réPLICATION cellulaire du circovirus MAP et ainsi pour contrôler l'infection par ce virus. Les méthodes permettant de déterminer lesdites modulations étant bien connues de l'homme de l'art.

Cette modulation peut être réalisée par exemple par un agent capable de se lier à une protéine et ainsi d'inhiber ou de potentialiser son activité biologique, ou capable de se lier à une protéine d'enveloppe de la surface externe dudit virus et de bloquer la pénétration dudit virus dans la cellule hôte ou de favoriser l'action du système immunitaire de l'organisme infecté dirigé à l'encontre dudit virus. Cette modulation peut être également réalisée par un agent capable de se lier à une séquence

nucléotidique d'un ADN dudit virus et de bloquer par exemple l'expression d'un polypeptide dont l'activité biologique ou structurelle est nécessaire à la réPLICATION ou à la prolifération dudit virus cellules hôtes à cellules hôtes dans l'animal hôte.

5 L'invention concerne les composés susceptibles d'être sélectionnés par une méthode de sélection selon l'invention.

L'invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant un composé choisi parmi les 10 composés suivants :

- a) une séquence nucléotidique selon l'invention ;
- b) un polypeptide selon l'invention ;
- c) un vecteur ou une cellule transformée selon 15 l'invention ;
- d) un anticorps selon l'invention ; et
- e) un composé susceptible d'être sélectionné par une méthode de sélection selon l'invention, éventuellement en association avec un véhicule pharmaceutiquement 20 acceptable.

On entend désigner par quantité efficace, une quantité suffisante dudit composé ou anticorps, ou de polypeptide de l'invention, permettant de moduler la réPLICATION cellulaire de circovirus MAP.

25 L'invention concerne aussi une composition pharmaceutique selon l'invention pour la prévention ou le traitement d'une infection par le circovirus MAP.

L'invention vise en outre une composition immunogène et/ou vaccinale, caractérisée en ce qu'elle comprend un ou 30 plusieurs polypeptides selon l'invention et/ou un ou plusieurs polypeptides hybrides selon l'invention.

L'invention comprend aussi l'utilisation d'une cellule transformée selon l'invention, pour la préparation d'une composition vaccinale.

35 L'invention vise également une composition vaccinale, caractérisée en ce qu'elle contient une séquence nucléo-

tidique selon l'invention, un vecteur selon l'invention et/ou une cellule transformée selon l'invention.

L'invention concerne également les compositions vaccinales selon l'invention, pour la prévention ou le
5 traitement d'une infection par le circovirus MAP.

Les polypeptides de l'invention entrant dans les compositions immunogènes selon l'invention peuvent être sélectionnés par des techniques connues de l'homme de l'art comme par exemple sur la capacité desdits polypeptides à
10 stimuler les cellules T, qui se traduit par exemple par leur prolifération ou la sécrétion d'interleukines, et qui aboutit à la production d'anticorps dirigés contre lesdits polypeptides.

Chez la souris, chez laquelle une dose pondérale de la
15 composition vaccinale comparable à la dose utilisée chez l'homme est administrée, la réaction anticorps est testée par prélèvement du sérum suivi d'une étude de la formation d'un complexe entre les anticorps présents dans le sérum et l'antigène de la composition vaccinale, selon les
20 techniques usuelles.

Selon l'invention, lesdites compositions vaccinales seront de préférence en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable et, le cas échéant, avec un ou plusieurs adjuvants de l'immunité appropriés.

Aujourd'hui, divers types de vaccins sont disponibles pour protéger l'animal ou l'homme contre des maladies infectieuses : micro-organismes vivants atténués (*M. bovis* - BCG pour la tuberculose), micro-organismes inactivés (virus de la grippe), des extraits acellulaires
30 (*Bordetella pertussis* pour la coqueluche), protéines recombinées (antigène de surface du virus de l'hépatite B), des polyosides (pneumocoques). Des vaccins préparés à partir de peptides de synthèse ou de micro-organismes génétiquement modifiés exprimant des antigènes hétérologues sont en cours d'expérimentation. Plus récemment encore, des ADNs plasmidiques recombinés portant
35 des gènes codant pour des antigènes protecteurs ont été

proposés comme stratégie vaccinale alternative. Ce type de vaccination est réalisé avec un plasmide particulier dérivant d'un plasmide de *E. coli* qui ne se réplique pas *in vivo* et qui code uniquement pour la protéine vaccinante. Des animaux ont été immunisés en injectant simplement l'ADN plasmidique nu dans le muscle. Cette technique conduit à l'expression de la protéine vaccinale *in situ* et à une réponse immunitaire de type cellulaire (CTL) et de type humoral (anticorps). Cette double induction de la réponse immunitaire est l'un des principaux avantages de la technique de vaccination avec de l'ADN nu.

Les compositions vaccinales comprenant des séquences nucléotidiques ou des vecteurs dans lesquels sont insérées lesdites séquences, sont notamment décrites dans la demande internationale N° WO 90/11092 et également dans la demande internationale N° WO 95/11307.

La séquence nucléotidique constitutive de la composition vaccinale selon l'invention peut être injectée à l'hôte après avoir été couplée à des composés qui favorisent la pénétration de ce polynucléotide à l'intérieur de la cellule ou son transport jusqu'au noyau cellulaire. Les conjugués résultants peuvent être encapsulés dans des microparticules polymères, comme décrit dans la demande internationale N° WO 94/27238 (Medisorb Technologies International).

Selon un autre mode de réalisation de la composition vaccinale selon l'invention, la séquence nucléotidique, de préférence un ADN, est complexée avec du DEAE-dextran (Pagano et al., 1967) ou avec des protéines nucléaires (Kaneda et al., 1989), avec des lipides (Felgner et al., 1987) ou encapsulée dans des liposomes (Fraley et al., 1980) ou encore introduite sous la forme d'un gel facilitant sa transfection dans les cellules (Midoux et al., 1993, Pastore et al., 1994). Le polynucléotide ou le vecteur selon l'invention peut aussi être en suspension dans une solution tampon ou être associé à des liposomes.

Avantageusement, un tel vaccin sera préparé conformément à la technique décrite par Tacson et al. ou Huygen et al. en 1996 ou encore conformément à la technique décrite par Davis et al. dans la demande internationale N° WO 95/11307.

Un tel vaccin peut être également préparé sous la forme d'une composition contenant un vecteur selon l'invention, placée sous le contrôle d'éléments de régulation permettant son expression chez l'homme ou l'animal. On pourra par exemple utiliser, en tant que vecteur d'expression *in vivo* de l'antigène polypeptidique d'intérêt, le plasmide pcDNA3 ou le plasmide pcDNA1/neo, tous les deux commercialisés par Invitrogen (R & D Systems, Abingdon, Royaume-Uni). On peut aussi utiliser le plasmide V1Jns.tPA, décrit par Shiver et al. en 1995. Un tel vaccin comprendra avantageusement, outre le vecteur recombinant, une solution saline, par exemple une solution de chlorure de sodium.

On entend désigner par véhicule pharmaceutiquement acceptable, un composé ou une combinaison de composés entrant dans une composition pharmaceutique ou vaccinale ne provoquant pas de réactions secondaires et qui permet par exemple la facilitation de l'administration du composé actif, l'augmentation de sa durée de vie et/ou de son efficacité dans l'organisme, l'augmentation de sa solubilité en solution ou encore l'amélioration de sa conservation. Ces véhicules pharmaceutiquement acceptables sont bien connus et seront adaptés par l'homme de l'art en fonction de la nature et du mode d'administration du composé actif choisi.

En ce qui concerne les formulations vaccinales, celles-ci peuvent comprendre des adjuvants de l'immunité appropriés qui sont connus de l'homme de l'art, comme par exemple l'hydroxyde d'aluminium, un représentant de la famille des muramyl peptides comme un des dérivés peptidiques du N-acétyl-muramyl, un lysat bactérien, ou encore l'adjuvant incomplet de Freund.

Ces composés peuvent être administrés par voie systémique, en particulier par voie intraveineuse, par voie intramusculaire, intradermique ou sous-cutanée, ou par voie orale. De manière plus préférée, la composition vaccinale 5 comprenant des polypeptides selon l'invention, sera administrée au travers de l'alimentation ou par nébulisation à plusieurs reprises, de manière étalée dans le temps.

Leurs modes d'administration, posologies et formes 10 galéniques optimaux peuvent être déterminés selon les critères généralement pris en compte dans l'établissement d'un traitement adapté à un animal comme par exemple l'âge ou le poids, la gravité de son état général, la tolérance au traitement et les effets secondaires constatés.

15 La présente invention a également pour objet l'utilisation des séquences nucléotidiques du circovirus MAP selon l'invention, pour la construction de vecteurs rétroviraux autoréplicatifs et les applications thérapeutiques de celles-ci, notamment dans le domaine de la 20 thérapie génique humaine *in vivo*.

La faisabilité de la thérapie génique appliquée à l'homme n'est plus à démontrer et ceci concerne de nombreuses applications thérapeutiques comme les maladies génétiques, les maladies infectieuses et les cancers. De 25 nombreux documents de l'art antérieur décrivent les moyens de mettre en oeuvre une thérapie génique, notamment par l'intermédiaire de vecteurs viraux. D'une manière générale, les vecteurs sont obtenus par délétion d'au moins une partie des gènes viraux qui sont remplacés par les gènes d'intérêt thérapeutique. De tels vecteurs peuvent être propagés dans une lignée de complémentation qui fournit en trans les fonctions virales délétées pour générer une particule de vecteur viral défective pour la réPLICATION mais capable d'infecter une cellule hôte. A ce jour, les 30 vecteurs rétroviraux sont parmi les plus utilisés et leur mode d'infection sont largement décrits dans la littérature accessible à l'homme de l'art.

Le principe de la thérapie génique est de délivrer un gène fonctionnel, dit gène d'intérêt, dont l'ARN ou la protéine correspondante produira l'effet biochimique désiré dans les cellules ou tissus ciblés. D'une part, l'insertion de gènes permet l'expression prolongée de molécules complexes et instables comme des ARNs ou des protéines qui peuvent être extrêmement difficiles voire impossibles à obtenir ou à administrer directement. D'autre part, l'insertion contrôlée du gène désiré à l'intérieur de cellules spécifiques ciblées permet de réguler le produit d'expression dans des tissus définis. Pour cela, il est nécessaire de pouvoir insérer le gène thérapeutique désiré à l'intérieur de cellules choisies et donc de disposer de méthode d'insertion capable de cibler spécifiquement les cellules ou les tissus choisies.

Parmi les méthodes d'insertion de gènes, comme par exemple la micro-injection, notamment l'injection d'ADN plasmidique nu (Derse, D. et al., 1995, et Zhao, T.M. et al., 1996), l'électroporation, la recombinaison homologue, l'utilisation de particules virales, comme les rétrovirus, est largement répandue. Cependant, appliqués *in vivo*, les systèmes de transfert de gène de type rétroviral recombinant présentent à la fois un faible pouvoir infectieux (concentration insuffisante de particules virales) et un manque de spécificité vis-à-vis des cellules cibles choisies.

La réalisation de vecteurs viraux cellules spécifiques, présentant un tropisme tissu-spécifique, et dont la transduction du gène d'intérêt peut être effectuée de manière adéquate par les cellules cibles, est réalisable par exemple en fusionnant un ligand spécifique des cellules hôtes cibles à la partie N-terminale d'une protéine de surface de l'enveloppe du circovirus MAP. On peut citer par exemple la construction de particules rétrovirales présentant la molécule CD4 à la surface de l'enveloppe de manière à cibler les cellules humaines infectées par le virus HIV (YOUNG, J.A.T. et al., Sciences 1990, 250, 1421-

1423), de particules virales présentant une hormone peptidique fusionnée avec une protéine de l'enveloppe pour infecter spécifiquement les cellules exprimant le récepteur correspondant (KASAHARA, N. et al., Sciences 1994, 266, 5 1373-1376) ou bien encore de particules virales présentant un polypeptide fusionné capable de se fixer sur le récepteur du facteur de croissance de l'épiderme (EGF) (COSSET, F.L. et al., J. of Virology 1995, 69, 10, 6314-6322). Dans une autre approche, des fragments simple 10 chaîne d'anticorps dirigés contre des antigènes de surface des cellules cibles, sont insérés par fusion à la partie N-terminale de la protéine d'enveloppe (VALSESIA-WITTMAN, S. et al., J. of Virology 1996, 70, 3, 2059-2064 ; TEARINA CHU, T. H. et al., J. of Virology 1997, 71, 1, 720-725).

15 Aux fins de la présente invention, un gène d'intérêt en usage dans l'invention peut être obtenu d'un organisme eucaryote, procaryote ou d'un virus par toute technique conventionnelle. Il est, de préférence, capable de produire un produit d'expression ayant un effet thérapeutique et il 20 peut s'agir d'un produit homologue à la cellule hôte ou, de manière alternative, hétérologue. Dans le cadre de la présente invention, un gène d'intérêt peut coder pour un produit (i) intracellulaire (ii) membranaire présent à la surface de la cellule hôte ou (iii) secrété hors de la 25 cellule hôte. Il peut donc comprendre des éléments additionnels appropriés comme, par exemple, une séquence codant pour un signal de sécrétion. Ces signaux sont connus de l'homme de l'art..

Conformément aux buts poursuivis par la présente 30 invention, un gène d'intérêt peut coder pour une protéine correspondant à tout ou partie d'une protéine native telle que trouvée dans la nature. Il peut également s'agir d'une protéine chimérique, par exemple provenant de la fusion de polypeptides d'origines diverses ou d'un mutant présentant 35 des propriétés biologiques améliorées et/ou modifiées. Un tel mutant peut être obtenu par des techniques de biologie classiques par substitution, délétion et/ou addition d'un

ou plusieurs résidus acides aminés.

On préfère tout particulièrement mettre en oeuvre un gène d'intérêt thérapeutique codant pour un produit d'expression capable d'inhiber ou retarder l'établissement et/ou le développement d'une maladie génétique ou acquise. Un vecteur selon l'invention est particulièrement destiné à la prévention ou au traitement de la mucoviscidose, de l'hémophilie A ou B, de la myopathie de Duchenne ou de Becker, du cancer, du SIDA et d'autres bactéries ou maladies infectieuses dues à un organisme pathogène : virus, bactérie, parasite ou prion. Les gènes d'intérêt utilisables dans la présente invention, sont ceux qui codent par exemple pour les protéines suivantes :

- une cytokine et notamment une interleukine, un interféron, un facteur de nécrose tissulaire et un facteur de croissance et notamment hématopoïétique (G-CSF, GM-CSF),

- un facteur ou cofacteur impliqué dans la coagulation et notamment le facteur VIII, le facteur von Willebrand, l'antithrombine III, la protéine C, la thrombine et l'hirudine,

- une enzyme ou un inhibiteur d'enzyme tel que les inhibiteurs de protéases virales,

- un produit d'expression d'un gène suicide comme la thimidine kinase du virus HSV (virus de l'herpès) de type 1,

- un activateur ou un inhibiteur de canaux ioniques,

- une protéine dont l'absence, la modification ou la dérégulation de l'expression est responsable d'une maladie génétique, telle que la protéine CFTR, la dystrophine ou minidystrophine, l'insuline, l'ADA (adénosine diaminose), la glucocérébrosidase et la phénylhydroxylase,

- une protéine capable d'inhiber l'initiation ou la progression de cancers, tels que les produits d'expression des gènes suppresseurs de tumeurs, par exemple les gènes P53 et Rb,

- une protéine capable de stimuler une réponse immunitaire ou un anticorps, et

5 - une protéine capable d'inhiber une infection virale ou son développement, par exemple les épitopes antigéniques du virus en cause ou des variants altérés de protéines virales susceptibles d'entrer en compétition avec les protéines virales natives.

L'invention concerne ainsi les vecteurs caractérisés en ce qu'ils comprennent une séquence nucléotidique de 10 circovirus MAP selon l'invention, et en ce qu'ils comprennent en outre un gène d'intérêt.

La présente invention concerne également des particules virales générées à partir dudit vecteur selon 15 l'invention. Elle concerne de plus des méthodes pour la préparation de particules virales selon l'invention, caractérisées en ce qu'elles mettent en oeuvre un vecteur selon l'invention, incluant les pseudoparticules virales (VLP, Virus-Like Particles).

L'invention a également pour objet des cellules 20 animales transfectées par un vecteur selon l'invention.

Sont également comprises dans l'invention les cellules animales, notamment de mammifères, infectées par une particule virale selon l'invention.

La présente invention concerne également un vecteur, 25 une particule virale ou une cellule selon l'invention, pour le traitement et/ou la prévention d'une maladie génétique ou d'une maladie acquise comme le cancer ou une maladie infectieuse. L'invention s'adresse également à une composition pharmaceutique comprenant à titre d'agent 30 thérapeutique ou prophylactique un vecteur ou une cellule selon l'invention, en association avec un véhicule acceptable d'un point de vue pharmaceutique.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention 35 apparaissent dans les exemples et les figures suivants :

Légendes des figures :

Figure 1 : Schéma expérimental ayant permis d'aboutir au circovirus associé au MAP.

5 Essai 1 : reproduction expérimentale du MAP par inoculation de broyats d'organes de porcs d'élevages atteints de MAP.

 Essai 2 : reproduction expérimentale du MAP.

 Essai 3 : reproduction expérimentale du MAP.

10 Essai 4 : pas de reproduction expérimentale du MAP.

Figure 2 : Séquence nucléotidique SEQ ID N° 1 du génome du circovirus associé au MAP, brin de polarité (+).

15 Figure 3 : Organisation du génome du circovirus associé au MAP, brin de polarité + et - dans les trois cadres de lecture.

20 Figure 4 : Séquence d'acides aminés de polypeptide codé par la séquence nucléotidique ORF1 du circovirus associé au MAP (souche DFP) correspondant à la protéine REP.

25 Figure 5 : Séquence d'acides aminés de polypeptide codé par la séquence nucléotidique ORF2 du circovirus associé au MAP (souche DFP).

Figure 6 : Séquence d'acides aminés de polypeptide codé par la séquence nucléotidique ORF3 du circovirus associé au MAP (souche DFP).

30 Figure 7 : Alignement de la séquence nucléotidique du circovirus MAP et des circovirus souche MEEHAN et souche MANKERTZ des lignées cellulaires porcines.

35 Figure 8 : Alignement de la séquence d'acides aminés de polypeptide codé par la séquence nucléotidique ORF1 du

circovirus MAP et des circovirus souche MEEHAN et souche MANKERTZ des lignées cellulaires porcines.

Figure 9 : Alignement de la séquence d'acides aminés de 5 polypeptide codé par la séquence nucléotidique ORF2 du circovirus MAP et des circovirus souche MEEHAN et souche MANKERTZ des lignées cellulaires porcines.

Figure 10 : Alignement de la séquence d'acides aminés de 10 polypeptide codé par la séquence nucléotidique ORF3 du circovirus MAP et des circovirus souche MEEHAN et souche MANKERTZ des lignées cellulaires porcines.

Figure 11 : Analyse par Western-Blot des protéines recombinantes du circovirus MAP.

Les analyses ont été réalisées sur des extraits cellulaires de cellules Sf9 obtenus après infection par le baculovirus recombinant PCV ORF 1.

20 EXEMPLES

1 - Procédures expérimentales

Reproduction expérimentale de l'infection et de son syndrome (cf. figure 1).

Un premier essai a été effectué avec des porcs issus d'un élevage de très bonne tenue, mais atteint de la maladie de l'amaigrissement du porcelet (MAP) ou dénommée également DFP (Dépérississement Fatal du Porcelet). Des épreuves contact avec des porcs EOPS (Exempts d'organismes pathogènes spécifiés) a montré un transfert de contaminant(s) se traduisant par une pathologie complexe associant hyperthermie, ralentissement de la croissance, diarrhée et conjonctivite. Le virus SDRP (syndrome dysgénésique et respiratoire porcin, maladie infectieuse due à un artérovirus) a été rapidement isolé à partir des porcs d'élevage et des porcs contact. L'ensemble des signes cliniques aurait pu être attribué à la présence du virus

SDRP. Toutefois, deux porcs d'élevage ont présenté des signes de DFP sans que le virus SDRP soit isolé. Les analyses histologiques et formules sanguines ont cependant montré que ces porcs étaient atteints d'un processus infectieux d'origine virale.

Dans un deuxième essai, des porcs SPF de 8 semaines ont été inoculés par voie intratrachéale avec les broyats d'organes provenant des deux porcs d'élevage atteints de DFP. Les porcs inoculés ont présenté de l'hyperthermie 8 à 10 jours post-infection, puis leur croissance a été ralentie. D'autres porcs SPF, placés au contact, ont présenté des signes similaires, atténus, 30 jours après l'épreuve initiale. Aucune séroconversion vis-à-vis d'une souche européenne ou canadienne de virus SDRP n'a été enregistrée chez ces animaux.

Un troisième essai a permis de reproduire le syndrome à partir de prélèvements effectués sur les porcs du second essai.

Conclusion

Le syndrome est reproduit dans les conditions expérimentales. Il est déterminé par un agent infectieux, transmissible par contact direct. Les constantes cliniques sont une hyperthermie parfois élevée (supérieure ou égale 41,5°C) qui se développe 8 à 10 jours après infection. Un ralentissement de la croissance peut être observé. Les autres manifestations sont une inversion de la formule sanguine (inversion du rapport lymphocyte/polynucléaire de 70/30 à 30/70) et des lésions fréquentes sur les ganglions, notamment ceux drainant l'appareil respiratoire (hypertrophie ganglionnaire; perte de structure avec nécrose et infiltration par des cellules mononucléées ou plurinucléées géantes).

2 - Etudes en laboratoire

Divers supports cellulaires incluant des cellules de rein de porc primaires ou en lignée, des cellules de testicule de porc, des cellules de rein de singe, des lymphocytes de porc, des macrophages alvéolaires de porc,

des monocytes du sang circulant, ont été utilisés pour mettre en évidence la présence éventuelle d'un virus. Aucun effet cytopathique n'a été mis en évidence sur ces cellules. En revanche, l'utilisation d'un sérum de porc malade après infection expérimentale a permis de révéler un antigène intracellulaire dans les monocytes, les macrophages et environ 10 % des cellules de rein de porc infectées avec les broyats d'organe. Cette révélation indirecte a été faite en cinétique à différents temps de culture. Il en ressort que l'antigène apparaît initialement dans le noyau des cellules infectées avant de se répandre dans le cytoplasme. Les passages successifs en culture cellulaire n'ont pas permis d'amplifier le signal.

En microscopie électronique sur des broyats d'organes, il a été visualisé des particules sphériques marquées spécifiquement par le sérum de porcs malades, infectés dans les conditions expérimentales. La taille de ces particules est estimée à 20 nm.

Après deux passages de ces broyats d'organes sur lymphocytes de porc puis trois passages sur cellules de rein ou de testicule de porc, un effet cytopathique s'est développé et a été amplifié. Au microscope électronique a été visualisé un adénovirus qui, dans les conditions expérimentales, n'a pas reproduit le DFP (on note seulement un pic d'hyperthermie 24 à 48 heures après infection, puis plus rien).

Des bandes d'ADN dans certains prélèvements de porcs infectés dans les conditions expérimentales et ayant présenté des signes de la maladie ont pu être mis en évidence (résultats non représentés). Il existe une certaine correspondance entre les prélèvements donnant un résultat positif en culture cellulaire et ceux présentant une bande d'ADN.

Conclusion

Deux virus ont été mis en évidence dans les broyats d'organes issus de porcs malades de DFP. L'un est un adénovirus, mais il ne reproduit pas à lui seul la maladie.

L'autre est un circovirus et est associé au DFP. Ce circovirus a été séquencé et il présente des mutations par rapport aux séquences connues sur les circovirus non pathogènes pour le porc.

5

3 - Clonage et séquençage de l'ADN du circovirus MAP

Extraction de l'ADN forme réplicative (RF), clivage par l'enzyme Kpn I et amplification par un couple d'amorces flanquant le site de restriction Kpn I. Séquençage des deux brins au moins deux fois par la méthode de Sanger.

10

4 - Comparaison des séquences nucléotidiques et d'acides aminés du circovirus MAP (ou associé à la MAP) obtenues avec les séquences correspondantes de circovirus MEEHAN et MANKERTZ de lignées cellulaires porcines

15

Utilisation du logiciel d'analyse de séquence d'ADN, DNASIS.

20

Séquences des oligonucléotides utilisés comme amorces ou sondes dans les procédés de détection et/ou d'identification

1. détection spécifique du circovirus MAP :

amorce PCV 5 : 5' GTG TGC TCG ACA TTG GTG TG 3' ;

amorce PCV 10 : 5' TGG AAT GTT AAC GAG CTG AG 3' ;

25

2. détection spécifique du circovirus des lignées cellulaires :

amorce PCV 5 : 5' GTG TGC TCG ACA TTG GTG TG 3' ;

amorce MEE1 : 5' TGG AAT GTT AAC TAC CTC AA 3' ;

3. détection différentielle :

30

les couples d'amorces utilisés sont ceux par exemple décrits dans les paragraphes 1 et 2 ci-dessus ;

4. détection des formes réplicatives RF (replicative forms) circulaires monomériques :

amorce PCV 5 : 5' GTG TGC TCG ACA TTG GTG TG 3' ;

amorce PCV 6 : 5' CTC GCA GCC ATC TTG GAA TG 3' ;

35

5. détection des vecteurs portant les dimères en tandem : dimère Nar :

amorce KS 620 : 5' CGC GCG TAA TAC GAC TCA CT 3' ;

amorce PCV 5 : 5' GTG TGC TCG ACA TTG GTG TG 3' ;

dimère Kpn :

amorce KS 620 : 5' CGC GCG TAA TAC GAC TCA CT 3' ;

5 amorce PCV 6 : 5' CTC GCA GCC ATC TTG GAA TG 3' ;

6.. détection différentielle :

les couples d'amorces utilisés sont ceux par exemple décrits dans les paragraphes 4 et 5 ci-dessus.

10 Les procédés utilisant les couples d'amorces décrits dans les paragraphes 4 et 5 sont particulièrement intéressants pour détecter de façon différentielle les formes monomériques circulaires de formes répliquatives spécifiques du virion ou de l'ADN en réPLICATION et les 15 formes dimériques retrouvées dans les constructions moléculaires dites en tandem.

Les constructions en tandem du génome viral (dimères) telles que les constructions utilisées pour la préparation du vecteur pBS KS+ Tandem PCV Kpn I, déposé à la CNCM sous le numéro I-1891, le 3 juillet 1197 (E-coli transformée par ledit vecteur) sont très intéressantes pour leur utilisation dans des méthodes de production en quantité suffisante d'un inoculum constitué d'ADN, destiné à la production de virus et ceci en l'absence de protocole 25 satisfaisant de production de virus sur système cellulaire. Cesdites méthodes de production utilisant ces constructions en tandem du génome viral permettront d'étudier par mutation les facteurs de virulence et par voie de conséquence pourront être utilisées pour la fabrication 30 d'une collection de virus portant les mutations indiquées dans la construction des vecteurs qui présenteront le tropisme et la virulence appropriés. Ces vecteurs à structure autoréplicative présentent des propriétés recherchées en transfert de gènes, notamment pour leurs 35 applications en thérapie génique, et en vaccinologie.

Analyse par Western-Blot des protéines recombinantes du circovirus MAP

Les résultats ont été obtenus en utilisant un antisérum spécifique du circovirus MAP produit lors de l'essai 1 (cf. figure 1).

Type de produits analysés

Les analyses ont été réalisées sur des extraits cellulaires de cellules Sf9 obtenus après infection par le baculovirus recombinant PCV ORF 1.

La culture des cellules Sf9 a été réalisée sur boîte de Pétri de 25 cm² selon les méthodes de culture standard pour ces cellules. Après centrifugation, les culots cellulaires sont repris par 300 µl de tampon PBS (tampon phosphate salin).

Electrophorèse (PAGE- SDS)

L'électrophorèse est réalisée sur les extraits cellulaires de cellules Sf9 obtenus précédemment sur 5 échantillons (cf. tableau 1 ci-dessous) dans les conditions suivantes :

% gel de polyacrylamide : 8 % ; Conditions : dénaturantes
Voltage : 80 V ; Durée : 135 mn.

Tableau 1 : Nature des échantillons soumis à l'électrophorèse

25

N° puits	1	2	3	4	5
dépôts	PM Rainbow	Raoul 24 h	Raoul 48 h	Raoul 72 h	Raoul 96 h
µl échant.	10	15	15	15	15
µl Laemli 4X	0	5	5	5	5

Légendes du tableau 1 :

Laemli 4X : tampon de charge

PM Rainbow : marqueurs de poids moléculaire (35, 52, 77, 107, 160 et 250 kD)

5 Raoul 24 h, 48h, 72h et 96h : produits d'expression de l'ORF1 du circovirus MAP.

Western-blot

Après électrophorèse, les bandes obtenues dans les différents puits sont transférés sur membrane de 10 nitrocellulose pendant 1 h à 100 v dans un tampon TGM. (Tris-glycine-méthanol).

Le Western-blot est réalisé dans les conditions suivantes :

1) Saturation par une solution contenant 5 % de lait écrémé ; 0,05 % Tween 20 dans un tampon TBS 1X (Tris buffer saline) pendant 30 min.

2) 1er anticorps :

20 10 ml d'anticorps anticircovirus MAP sont ajoutés dilués au 1/100, puis le milieu réactionnel est incubé une nuit à 4°C. Trois lavages de 10 min. en TBS 1X sont effectués.

3) 2ème anticorps :

25 10 ml d'anticorps P164 de lapin anti-immunoglobulines de porc, couplés à la peroxydase (Dakopath) sont ajoutés dilués au 1/100, puis le milieu réactionnel est incubé 3 heures à 37°C. Trois lavages de 10 min. en TBS 1X sont effectués.

4) Révélation

30 Le sustrat 4-Chloro-1-Naphtol, en présence d'eau oxygénée est utilisé pour la révélation.

Résultats

Les résultats sont représentés à la figure 11.

35 Cinétique d'apparition des anticorps spécifiques de la protéine recombinante REP du circovirus MAP exprimé en baculovirus après infection des porcs par le circovirus MAP (essai 4, cf. figure 1)

Après infections des porcs, un échantillon de sérum de chacun des porcs infectés est prélevé à différentes périodes exprimées dans le tableau par la date du prélèvement (effectué ici la même année) puis est analysée 5 par Western-blot.

La révélation des anticorps spécifiques est réalisée de la manière décrite précédemment.

Les résultats obtenus sont représentés par le tableau 2 ci-dessous.

10

Tableau 2 : Cinétique d'apparition des anticorps spécifiques

Echan.	Porcs	10/06	16/06	23/06	01/07	08/07	15/07	21/07
A3	1							
Témoin-	2						Nég.	
B2	1	Nég.	Nég.	Nég.	+	+	++	+++
Infec.	2	Nég.						
RP+	3	Nég.	Nég.	Nég.	Nég.	+	+	+
	4	Nég.	Nég.	Nég.	Nég.	Nég.	Nég.	++

15 Légendes du tableau 2 :

A3 Témoin : animaux témoins non infectés,

B2 Infec. RP+ : animaux infectés avec des cellules de rein de porcs (RP) contenant le circovirus,

Nég. : négatif,

20 +, ++, +++ : échelle d'intensité de la réaction positive.

Références bibliographiques

Allan, G. M. et al., 1995, *Vet. Microbiol.*, 44 : 49-64.

Barany, F., 1911, *PNAS. USA*, 88 : 189-193.

Boulton, L.H. et al., 1997, *J. Gen. Virol.*, 78 (Pt 6), 5 1265-1270.

Buckholz, R.G., 1993, Yeast systems for the expression of heterologous gene products. *Curr. Op. Biotechnology* 4 : 538-542.

Burg, J.L. et al., 1996, *Mol. and Cell. Probes*, 10 : 257-10 271.

Chu, B.C.F. et al., 1986, *NAR*, 14 : 5591-5603.

Chu, P.W.G. et al., 1993, *Virus Research*, 27 : 161-171.

Clark, E.G., 1997, American Association of Swine Practitioners, 499-501.

Daft, B. et al., 1996, American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, 32.

Derse, D. et al., 1995, *J. Virol.*, 69(3) : 1907-1912.

Duck, P. et al., 1990, *Biotechniques*, 9 : 142-147.

Dulac, G.C. et al., 1989, *Can. J. Vet. Res.*, 53 : 431-433.

Edwards, C.P., and Aruffo, A., 1993, Current applications of COS cell based transient expression systems. *Curr. Op. Biotechnology* 4 : 558-563.

Edwards, S. et al., 1994, *Vet. Rec.*, 134 : 680-681.

Erlich, H.A., 1989, In PCR Technology. Principles and 25 Applications for DNA Amplification. New York : Stockton Press.

Felgner, et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84 : 7413.

Fontes, E.P.B. et al., 1994, *J. Biol. Chem.*, Vol. 269, N° 11 : 8459-8465.

Fraley et al., 1980, *J. Biol. Chem.*, 255 : 10431.

Guateli, J.C. et al., 1990, *PNAS. USA*, 87 : 1874-1878.

Hackland, A.F. et al., 1994, Arch. Virol., 139 : 1-22.

Hanson, S.F. et al., 1995, Virology, 211 : 1-9.

Harding, J.C., 1997, American Association of Swine Practitioners, 503.

5 Harding, R.M. et al., 1993, Journal of General Virology, 74 : 323-328.

Harding, J.C. et Clark, E.G., 1997, Swine Health and Production, Vol. 5, N° 5 : 201-203.

Heyraud-Nitschke, F. et al., 1995, Nucleic Acids Research, 10 Vol. 23, N° 6.

Horner, G.W., 1991, Surveillance 18(5) : 23.

Houbenweyl, 1974, in Meuthode der Organischen Chemie, E. Wunsch Ed., Volume 15-I et 15-II, Thieme, Stuttgart.

Huygen, K. et al., 1996, Nature Medicine, 2(8) : 893-898.

15 Innis, M.A. et al., 1990, in PCR Protocols. A guide to Methods and Applications. San Diego : Academic Press.

Kaneda, et al., 1989, Science, 243 : 375.

Kievitis, T. et al., 1991, J. Virol. Methods, 35 : 273-286.

20 Kohler, G. et al., 1975, Nature, 256(5517) : 495-497.

Kwoh, D.Y. et al., 1989, PNAS. USA, 86 : 1173-1177.

Ladany, S. et. al., 1989, J. Clin. Microbiol. 27 : 2778-2783.

Lazarowitz, S. G. et al., 1989, The EMBO Journal, Vol. 8 25 N° 4 : 1023-1032.

Luckow, V.A., 1993, Baculovirus systems for the expression of human gene products. Curr. Op. Biotechnology 4 : 564-572.

Mankertz, A. et al., 1997, J. Virol., 71 : 2562-2566.

30 Matthews, J.A. et al., 1988, Anal. Biochem., 169 : 1-25.

McNeilly, F. et al., 1996, Vet. Immunol. Immunopathol., 49 : 295-306.

Meehan, B.M. et al., 1997, J. Gen. Virol., 78 : 221-227.

Merrifield, R.D., 1966, J. Am. Chem. Soc., 88(21) : 5051-5052.

Midoux, 1993, Nucleic Acids Research, 21 : 871-878.

Miele, E.A. et al., 1983, J. Mol. Biol., 171 : 281-295.

Murphy, F.A. et al., 1995, Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer-Verlag Wien New York.

Nayar, G.P. et al., 1997, Can. Vet. J. 38(6) : 385-386.

Olins, P.O., and Lee, S.C., 1993, Recent advances in heterologous gene expression in E. coli. Curr. Op. Biotechnology 4 : 520-525.

Pagano et al., 1967, J. Virol., 1 : 891.

Rolfs, A. et al., 1991, In PCR Topics. Usage of Polymerase Chain reaction in Genetic and Infectious Disease. Berlin : Springer-Verlag.

Sambrook, J. et al., 1989, In Molecular cloning : A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY : Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanchez-Pescador, R., 1988, J. Clin. Microbiol., 26(10) : 1934-1938.

Segev D., 1992, in «Non-radioactive Labeling and Detection of Biomolecules». Kessler C. Springer Verlag, Berlin, New-York : 197-205.

Shiver, J.W., 1995, in Vaccines 1995, eds Chanock, R.M. Brown, F. Ginsberg, H.S. & Norrby, E., pp.95-98, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Tascon, R.E et al., 1996, Nature Medicine, 2(8) : 888-892.

Tischer, I. et al., 1982, Nature, 295 : 64-66.

Tischer, I. et al., 1986, Arch. Virol., 91 : 271-276.

Tischer, I. et al., 1988, Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A] 270 : 280-287.

5 Tischer, I. et al., 1995, Arch. Virol., 140 : 737-743.

Urdea, M.S., 1988, Nucleic Acids Research, 11 : 4937-4957.

Walker, G.T. et al., 1992, NAR 20 : 1691-1696.

Walker, G.T. et al., 1992, PNAS. USA, 89 : 392-396.

White, B.A. et al., 1997, Methods in Molecular Biology,
10 67, Humana Press, Towota.

Zhao, T.M. et al., 1996, Proc. Natl. Adac. Sci., USA,
93(13) : 6653-6658.

REVENDICATIONS

1. Séquence nucléotidique de séquence SEQ ID N° 1 du génome de circovirus MAP.

5

2. Séquence nucléotidique de circovirus MAP, caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi :

- a) une séquence nucléotidique de fragment spécifique de la séquence SEQ ID N° 1 ;
- 10 b) une séquence nucléotidique homologue à une séquence nucléotidique telle que définie en a) ;
- c) une séquence nucléotidique complémentaire de la séquence SEQ ID N° 1 ou complémentaire d'une séquence nucléotidique telle que définie en a) ou b), et une séquence nucléotidique de leur ARN correspondant ;
- 15 d) une séquence nucléotidique capable de s'hybrider dans des conditions stringentes avec une séquence telle que définie en a), b), ou c) ;
- e) une séquence nucléotidique comprenant la séquence SEQ ID N° 1 ou une séquence telle que définie en a), b), c) ou d) ; et
- f) une séquence nucléotidique modifiée d'une séquence nucléotidique telle que définie en a), b), c), d) ou e).

25 3. Séquence nucléotidique selon la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi les séquences ORF1 à ORF3.

30 4. Séquence nucléotidique selon la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence nucléotidique choisie parmi :

- a) une séquence nucléotidique ORF1, ORF2 ou ORF3 selon la revendication 3 ;
- b) une séquence nucléotidique de fragment spécifique d'une séquence ORF1, ORF2 ou ORF3 selon la revendication 3 ou d'une séquence telle que définie en a) ;

c) une séquence nucléotidique homologue comportant au moins 80 % d'identité avec une séquence nucléotidique ORF1, ORF2 ou ORF3 selon la revendication 3 ou telle que définie en a) ou b) ;

5 d) une séquence nucléotidique complémentaire ou d'ARN correspondant à une séquence ORF1, ORF2 ou ORF3 selon la revendication 3 ou telle que définie en a), b) ou c) ; et

e) une séquence nucléotidique modifiée d'une séquence ORF1, 10 ORF2 ou ORF3 selon la revendication 3 ou telle que définie en a), b), c), ou d).

5. Séquence nucléotidique selon l'une des revendications 2 à 4, caractérisée en ce que la séquence nucléotidique de fragment spécifique comprend une séquence nucléotidique choisie parmi les séquences suivantes :

a) 5' TGTGGCGA 3' ;
b) 5' AGTTTCCT 3' ;
c) 5' TCATTAGAGGGTCTTCAG 3' ;
20 d) 5' GTCAAACCT 3' ;
e) 5' GTGGTTGC 3' ;
f) 5' AGCCCAGG 3' ;
g) 5' TTGGCTGG 3' ;
h) 5' TCTAGCTCTGGT 3' ;
25 i) 5' ATCTCAGCTCGT 3' ;
j) 5' TGTCCTCCTCTT 3' ;
k) 5' TCTCTAGA 3' ;
l) 5' TGTACCAA 3' ;
m) 5' TCCGTCTT 3' ; et leur séquence complémentaire.

30

6. Polypeptide codé par une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 1 à 5.

7. Polypeptide selon la revendication 6, caractérisé 35 en ce que sa séquence est représentée par un fragment spécifique d'une des six séquences d'acides aminés représentées à la figure 3.

8. Polypeptide selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les séquences SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3 et SEQ ID N° 4.

5 9. Polypeptide caractérisé en ce qu'il comprend un polypeptide choisi parmi :

- a) un polypeptide selon la revendication 8 ;
- b) un fragment spécifique d'au moins 5 acides aminés d'un polypeptide selon la revendication 8, ou tel que défini 10 en a) ;
- c) un polypeptide homologue à un polypeptide selon la revendication 8, ou tel que défini en a) ou b) ;
- d) un fragment spécifique biologiquement actif d'un polypeptide selon la revendication 8, ou tel que défini 15 en a), b) ou c) ; et
- e) un polypeptide modifié d'un polypeptide selon la revendication 8, ou tel que défini en a), b), c) ou d).

20 10. Séquence nucléotidique codant pour un polypeptide selon la revendication 9.

25 11. Séquence nucléotidique utilisable comme amorce ou sonde, caractérisée en ce que ladite séquence est choisie parmi les séquences nucléotidiques selon l'une des revendications 1 à 5, et 10.

30 12. Séquence nucléotidique selon la revendication 11, caractérisée en ce que ladite séquence est l'une des amorces de couple d'amorces choisie parmi les couples suivants :

- a) 5' GTG TGC TCG ACA TTG GTG TG 3', et
5' TGG AAT GTT AAC GAG CTG AG 3' ;
- b) 5' GTG TGC TCG ACA TTG GTG TG 3', et
5' CTC GCA GCC ATC TTG GAA TG 3' ;
- c) 5' CGC GCG TAA TAC GAC TCA CT 3', et
5' GTG TGC TCG ACA TTG GTG TG 3' ;

d) 5' CGC GCG TAA TAC GAC TCA CT 3', et
5' CTC GCA GCC ATC TTG GAA TG 3'.

13. Séquence nucléotidique de circovirus porcin autre
5 que circovirus MAP, caractérisée en ce que ladite séquence
est une séquence consensus spécifique et en ce qu'elle fait
partie du couple d'amorces suivant :

a) 5' GTG TGC TCG ACA TTG GTG TG 3', et
5' TGG AAT GTT AAC TAC CTC AA 3'.

10.

14. Séquence nucléotidique selon l'une des revendications 11 à 13, caractérisée en ce qu'elle est marquée par un composé radioactif ou par un composé non radioactif.

15.

15. Séquence nucléotidique selon l'une des revendications 11 à 14, caractérisée en ce quelle est immobilisée sur un support, de manière covalente ou non covalente.

20

16. Séquence nucléotidique selon l'une des revendications 10 à 13, pour la détection et/ou l'amplification de séquences nucléiques..

25

17. Vecteur de clonage, et/ou d'expression, caractérisé en ce qu'il contient une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 1 à 5, et 10.

30

18. Vecteur caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 1 à 5, et 10, et en ce qu'il comprend en outre un gène d'intérêt.

35

19. Particule ou pseudoparticule virale générée à partir d'un vecteur selon l'une des revendications 17 à 18.

20. Cellule hôte, caractérisée en ce qu'elle est transformée par un vecteur selon l'une des revendications 17 à 18, ou une particule virale selon la revendication 20.

5 21. Animal, comprenant une cellule transformée selon la revendication 20.

10 22. Procédé de préparation d'un polypeptide, caractérisé en ce qu'il met en oeuvre un vecteur selon l'une des revendications 17 et 18 , une cellule transformée par ledit vecteur et/ou un animal comprenant ladite cellule transformée.

15 23. Polypeptide recombinant susceptible d'être obtenu par un procédé selon la revendication 22.

20 24. Procédé de préparation d'un polypeptide synthétique, caractérisé en ce qu'il utilise une séquence d'acides aminés d'un polypeptide selon l'une des revendications 6 à 9.

25 25. Polypeptide synthétique obtenu par un procédé selon la revendication 24.

26. Polypeptide hybride, caractérisé en ce qu'il comporte au moins la séquence d'un polypeptide selon l'une des revendications 6 à 9, 23 et 25 et une séquence d'un polypeptide susceptible d'induire une réponse immunitaire chez l'homme ou l'animal.

30

27. Polypeptide hybride selon la revendication 26, caractérisé en ce qu'il comporte au moins la séquence d'un polypeptide selon l'une des revendications 6 à 9, 23 et 25, et une séquence d'un polypeptide susceptible d'induire une réponse humorale et/ou cellulaire chez l'homme ou l'animal.

28. Séquence nucléotidique codant pour un polypeptide hybride selon l'une des revendications 26 à 27.

29. Vecteur caractérisé en ce qu'il contient une 5 séquence nucléotidique selon la revendication 28.

30. Polypeptide hybride selon l'une des revendications 26 à 27, caractérisée en ce qu'il s'agit d'un polypeptide recombinant obtenu par la mise en oeuvre 10 d'un vecteur selon la revendication 29.

31. Procédé pour la détection et/ou l'identification de circovirus MAP dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

15 a) mise en contact de l'échantillon biologique avec un polypeptide selon l'une des revendications 6 à 9, 23 et 25 ;
b) mise en évidence du complexe antigène-anticorps éventuellement formé.

20 32. Kit ou nécessaire pour la détection et/ou l'identification de circovirus MAP, caractérisé en ce qu'il comprend les éléments suivants :
a) un polypeptide selon l'une des revendications 6 à 9, 23

25 et 25 ;
b) le cas échéant, les réactifs pour la constitution du milieu propice à la réaction immunologique ;
c) les réactifs permettant mise en évidence des complexes antigène-anticorps éventuellement formés entre le ou les 30 polypeptides de l'invention et les anticorps ;
d) le cas échéant, un échantillon biologique de référence (témoin négatif) dépourvu d'anticorps reconnus par ledit polypeptide ;
e) le cas échéant, un échantillon biologique de référence 35 (témoin positif) contenant une quantité prédéterminée d'anticorps reconnus par ledit polypeptide.

33. Anticorps mono- ou polyclonaux, leurs fragments, ou anticorps chimériques, caractérisés en ce qu'ils sont capables de reconnaître spécifiquement un polypeptide selon l'une des revendications 6 à 9, 23 et 25.

5

34. Anticorps selon la revendication 33, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un anticorps marqué.

35. Procédé pour la détection et/ou l'identification
10 de circovirus MAP dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) mise en contact de l'échantillon biologique avec un anticorps selon l'une des revendications 33 ou 34 ;
- b) mise en évidence du complexe antigène-anticorps formé.

15

36. Kit ou nécessaire pour la détection et/ou l'identification de circovirus MAP, caractérisé en ce qu'il comprend les éléments suivants :

- a) un anticorps polyclonal ou monoclonal selon l'une des revendications 33 ou 34 ;
- b) le cas échéant, les réactifs pour la constitution du milieu propice à la réaction immunologique ;
- c) les réactifs permettant la mise en évidence des complexes antigène-anticorps produits par la réaction immunologique.

37. Procédé de détection et/ou d'identification de circovirus MAP ou de circovirus porcin autre que le circovirus MAP dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il met en oeuvre une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 11 à 16.

38. Procédé selon la revendication 37, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes :

- 35 a) le cas échéant, isolement de l'ADN à partir de l'échantillon biologique à analyser ;

- b) amplification spécifique de l'ADN de circovirus MAP à l'aide d'au moins une amorce selon l'une des revendications 11 à 16 ;
- c) mise en évidence des produits d'amplification.

5

39. Procédé selon la revendication 37, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) mise en contact d'une sonde nucléotidique selon l'une des revendications 11 à 16 avec un échantillon biologique, l'ADN contenu dans l'échantillon biologique ayant, le cas échéant, préalablement été rendu accessible à l'hybridation, dans des conditions permettant l'hybridation de la sonde à l'ADN de l'échantillon ;
- 15 b) mise en évidence de l'hybride éventuellement formé entre la sonde nucléotidique et l'ADN de l'échantillon biologique.

40. Procédé selon la revendication 37, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) mise en contact d'une sonde nucléotidique immobilisée sur un support selon la revendication 15, avec un échantillon biologique, l'ADN de l'échantillon, ayant, le cas échéant, été préalablement rendu accessible à l'hybridation, dans des conditions permettant l'hybridation de la sonde à l'ADN de l'échantillon ;
- 25 b) mise en contact de l'hybride formé entre la sonde nucléotidique immobilisée sur un support et l'ADN contenu dans l'échantillon biologique, le cas échéant après élimination de l'ADN de l'échantillon biologique n'ayant pas hybridé avec la sonde, avec une sonde nucléotidique marquée selon la revendication 14 ;
- c) mise en évidence du nouvel hybride formé à l'étape b).

35 41. Procédé selon la revendication 40, caractérisé en ce que, préalablement à l'étape a), l'ADN de l'échantillon

biologique, est amplifié à l'aide d'au moins une amorce selon l'une des revendications 11 à 16.

5 42. Kit ou nécessaire pour la détection et/ou l'identification de circovirus MAP associé, caractérisé en ce qu'il comprend les éléments suivants :

- a) une sonde nucléotidique selon l'une des revendications 11 à 16 ;
- b) le cas échéant, les réactifs nécessaires à la mise en oeuvre d'une réaction d'hybridation ;
- c) le cas échéant, au moins une amorce selon l'une des revendications 11 à 16, ainsi que les réactifs nécessaires à une réaction d'amplification de l'ADN.

15 43. Kit ou nécessaire pour la détection et/ou l'identification de circovirus MAP ou de circovirus porcin autre que le circovirus MAP, caractérisé en ce qu'il comprend les éléments suivants :

- a) une sonde nucléotidique, dite sonde de capture, selon la revendication 15 ;
- b) une sonde oligonucléotidique, dite sonde de révélation, selon la revendication 14 ;
- c) le cas échéant, au moins une amorce selon l'une des revendications 11 à 16, ainsi que les réactifs nécessaires à une réaction d'amplification de l'ADN.

30 44. Kit ou nécessaire pour la détection et/ou l'identification de circovirus MAP ou de circovirus porcin autre que le circovirus MAP, caractérisé en ce qu'il comprend les éléments suivants :

- a) au moins une amorce selon l'une des revendications 11 à 16 ;
- b) le cas échéant, les réactifs nécessaires pour effectuer une réaction d'amplification d'ADN ;
- c) le cas échéant, un composant permettant de vérifier la séquence du fragment amplifié, plus particulièrement une

sonde oligonucléotidique selon l'une des revendications 11 à 16.

45. Procédé ou kit ou nécessaire selon l'une des 5 revendications, pour le diagnostic d'une infection par le circovirus MAP ou par un circovirus porcin autre que le circovirus MAP.

46. Utilisation d'une séquence nucléotidique selon 10 l'une des revendications 1 à 5, et 10, d'un polypeptide selon l'une des revendications 6 à 9, 23 et 25, d'un anticorps selon l'une des revendications 33 et 34, d'une cellule selon la revendication 20, et/ou d'un animal transformé selon la revendication 21, pour la sélection de 15 composés organiques ou inorganiques capables de moduler, d'induire ou d'inhiber l'expression de gènes, et/ou de modifier la réPLICATION cellulaire du circovirus MAP ou capable d'induire ou d'inhiber chez le porc les pathologies liées à une infection par le circovirus MAP.

20

47. Méthode de sélection de composé capable de se lier à un polypeptide selon l'une des revendications 6 à 9, 23 et 25, capable de se lier à une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 1 à 5, et 10; ou capable de reconnaître un anticorps selon la revendication 33, et/ou capable de moduler, d'induire ou d'inhiber l'expression de gènes, et/ou de modifier la réPLICATION cellulaire du circovirus MAP, ou capable d'induire ou d'inhiber chez le porc les pathologies liées à une infection par le circovirus MAP, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

30

- a) mise en contact dudit composé avec ledit polypeptide, ladite séquence nucléotidique, avec une cellule transformée selon la revendication 20, et/ou administration dudit composé à un animal transformé selon la revendication 21 ;
- b) détermination de l'activité dudit composé.

48. Composé susceptible d'être sélectionné par une méthode selon la revendication 47.

49. Composition pharmaceutique comprenant un composé choisi parmi les composés suivants :

- a) une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 1 à 5, et 10 ;
- b) un polypeptide selon l'une des revendications 6 à 9, 23, 25 à 27, et 30 ;
- c) un vecteur ou une particule virale selon l'une des revendications 17 à 19, et 29, ou une cellule selon la revendication 20 ;
- d) un anticorps selon la revendication 33 ; et
- e) un composé selon la revendication 48.

15

50. Composition selon la revendication 49, éventuellement en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

20

51. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 49 et 50 pour la prévention ou le traitement d'une infection par le circovirus MAP.

25

52. Composition vaccinale, caractérisée en ce qu'elle comprend un ou plusieurs polypeptides selon l'une des revendications 6 à 9, 23 et 25 et/ou un ou plusieurs polypeptides hybrides selon l'une des revendications 26, 27 et 30.

30

53. Utilisation d'une cellule selon la revendication 20, pour la préparation d'une composition vaccinale.

35

54. Composition vaccinale, caractérisée en ce qu'elle contient une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 1 à 5, 10 et 28, un vecteur selon l'une des revendications 17, 18 et 29, et/ou une cellule selon revendication 20.

55. Composition vaccinale selon l'une des revendications 52 et 54, pour la prévention ou le traitement d'une infection par le circovirus MAP.

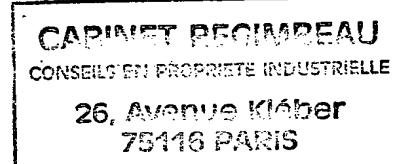
5 56. Composition vaccinale selon l'une des revendications 52, 54 et 55, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable et, le cas échéant, un ou plusieurs adjuvants de l'immunité appropriés.

10 57. Vecteur selon la revendication 18, particule virale selon la revendication 19, ou cellule selon la revendication 20, pour le traitement et/ou la prévention d'une maladie par thérapie génique.

15 58. Composition pharmaceutique comprenant à titre d'agent thérapeutique ou prophylactique, un vecteur selon la revendication 18, une particule virale selon la revendication 19 ou une cellule selon la revendication 20.

20

ORIGINAL



REVENDICATIONS

1. Séquence nucléotidique de séquence SEQ ID N° 1 du génome de circovirus MAP.

5

2. Séquence nucléotidique de circovirus MAP, caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi :

- a) une séquence nucléotidique de fragment spécifique de la séquence SEQ ID N° 1 ;
- 10 b) une séquence nucléotidique homologue à une séquence nucléotidique telle que définie en a) ;
- c) une séquence nucléotidique complémentaire de la séquence SEQ ID N° 1 ou complémentaire d'une séquence nucléotidique telle que définie en a) ou b), et une séquence nucléotidique de leur ARN correspondant ;
- 15 d) une séquence nucléotidique capable de s'hybrider dans des conditions stringentes avec une séquence telle que définie en a), b), ou c) ;
- e) une séquence nucléotidique comprenant la séquence SEQ ID N° 1 ou une séquence telle que définie en a), b), c) ou d) ; et
- f) une séquence nucléotidique modifiée d'une séquence nucléotidique telle que définie en a), b), c), d) ou e).

25

3. Séquence nucléotidique selon la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi les séquences ORF1 à ORF3.

30

4. Séquence nucléotidique selon la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence nucléotidique choisie parmi :

35

- a) une séquence nucléotidique ORF1, ORF2 ou ORF3 selon la revendication 3 ;
- b) une séquence nucléotidique de fragment spécifique d'une séquence ORF1, ORF2 ou ORF3 selon la revendication 3 ou d'une séquence telle que définie en a) ;

c) une séquence nucléotidique homologue comportant au moins 80 % d'identité avec une séquence nucléotidique ORF1, ORF2 ou ORF3 selon la revendication 3 ou telle que définie en a) ou b) ;

5 d) une séquence nucléotidique complémentaire ou d'ARN correspondant à une séquence ORF1, ORF2 ou ORF3 selon la revendication 3 ou telle que définie en a), b) ou c) ; et

e) une séquence nucléotidique modifiée d'une séquence ORF1, 10 ORF2 ou ORF3 selon la revendication 3 ou telle que définie en a), b), c), ou d).

5. Séquence nucléotidique selon l'une des revendications 2 à 4, caractérisée en ce que la séquence 15 nucléotidique de fragment spécifique comprend une séquence nucléotidique choisie parmi les séquences suivantes :

a) 5' TGTGGCGA 3' ;

b) 5' AGTTTCCT 3' ;

c) 5' TCATTTAGAGGGTCTTCAG 3' ;

20 d) 5' GTCAAACCT 3' ;

e) 5' GTGGTTGC 3' ;

f) 5' AGCCCAGG 3' ;

g) 5' TTGGCTGG 3' ;

h) 5' TCTAGCTCTGGT 3' ;

25 i) 5' ATCTCAGCTCGT 3' ;

j) 5' TGTCCTCCTCTT 3' ;

k) 5' TCTCTAGA 3' ;

l) 5' TGTACCAA 3' ;

m) 5' TCCGTCTT 3' ; et leur séquence complémentaire.

30

6. Polypeptide codé par une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 1 à 5.

7. Polypeptide selon la revendication 6, caractérisé 35 en ce que sa séquence est représentée par un fragment spécifique d'une des six séquences d'acides aminés représentées à la figure 3.

8. Polypeptide selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les séquences SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3 et SEQ ID N° 4.

5 9. Polypeptide caractérisé en ce qu'il comprend un polypeptide choisi parmi :

- a) un polypeptide selon la revendication 8 ;
- b) un fragment spécifique d'au moins 5 acides aminés d'un polypeptide selon la revendication 8, ou tel que défini 10 en a) ;
- c) un polypeptide homologue à un polypeptide selon la revendication 8, ou tel que défini en a) ou b) ;
- d) un fragment spécifique biologiquement actif d'un polypeptide selon la revendication 8, ou tel que défini 15 en a), b) ou c) ; et
- e) un polypeptide modifié d'un polypeptide selon la revendication 8, ou tel que défini en a), b), c) ou d).

20 10. Séquence nucléotidique codant pour un polypeptide selon la revendication 9.

25 11. Séquence nucléotidique utilisable comme amorce ou sonde, caractérisée en ce que ladite séquence est choisie parmi les séquences nucléotidiques selon l'une des revendications 1 à 5, et 10.

30 12. Séquence nucléotidique selon la revendication 11, caractérisée en ce que ladite séquence est l'une des amorces de couple d'amorces choisie parmi les couples suivants :

- a) 5' GTG TGC TCG ACA TTG GTG TG 3', et
5' TGG AAT GTT AAC GAG CTG AG 3' ;
- b) 5' GTG TGC TCG ACA TTG GTG TG 3', et
5' CTC GCA GCC ATC TTG GAA TG 3' ;
- c) 5' CGC GCG TAA TAC GAC TCA CT 3', et
5' GTG TGC TCG ACA TTG GTG TG 3' ;

d) 5' CGC GCG TAA TAC GAC TCA CT 3', et
5' CTC GCA GCC ATC TTG GAA TG 3'.

5 13. Séquence nucléotidique selon l'une des revendications 11 à 12, caractérisée en ce qu'elle est marquée par un composé radioactif ou par un composé non radioactif.

10 14. Séquence nucléotidique selon l'une des revendications 11 à 13, caractérisée en ce quelle est immobilisée sur un support, de manière covalente ou non covalente.

15 15. Séquence nucléotidique selon l'une des revendications 10 à 12, pour la détection et/ou l'amplification de séquences nucléiques.

20 16. Vecteur de clonage, et/ou d'expression, caractérisé en ce qu'il contient une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 1 à 5, et 10.

25 17. Vecteur caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 1 à 5, et 10, et en ce qu'il comprend en outre un gène d'intérêt.

18. Particule ou pseudoparticule virale générée à partir d'un vecteur selon l'une des revendications 16 à 17.

30 19. Cellule hôte, caractérisée en ce qu'elle est transformée par un vecteur selon l'une des revendications 16 à 17, ou une particule virale selon la revendication 18.

35 20. Animal, comprenant une cellule transformée selon la revendication 19.

21. Procédé de préparation d'un polypeptide, caractérisé en ce qu'il met en oeuvre un vecteur selon l'une des revendications 16 et 17, une cellule transformée par ledit vecteur et/ou un animal comprenant ladite cellule 5 transformée.

22. Polypeptide recombinant susceptible d'être obtenu par un procédé selon la revendication 21.

10 23. Procédé de préparation d'un polypeptide synthétique, caractérisé en ce qu'il utilise une séquence d'acides aminés d'un polypeptide selon l'une des revendications 6 à 9.

15 24. Polypeptide synthétique obtenu par un procédé selon la revendication 23.

20 25. Polypeptide hybride, caractérisé en ce qu'il comporte au moins la séquence d'un polypeptide selon l'une des revendications 6 à 9, 22 et 24 et une séquence d'un polypeptide susceptible d'induire une réponse immunitaire chez l'homme ou l'animal.

25 26. Polypeptide hybride selon la revendication 25, caractérisé en ce qu'il comporte au moins la séquence d'un polypeptide selon l'une des revendications 6 à 9, 22 et 24, et une séquence d'un polypeptide susceptible d'induire une réponse humorale et/ou cellulaire chez l'homme ou l'animal.

30 27. Séquence nucléotidique codant pour un polypeptide hybride selon l'une des revendications 25 à 26.

28. Vecteur caractérisé en ce qu'il contient une séquence nucléotidique selon la revendication 27.

35 29. Polypeptide hybride selon l'une des revendications 25 à 26, caractérisée en ce qu'il s'agit

d'un polypeptide recombinant obtenu par la mise en oeuvre d'un vecteur selon la revendication 28.

30. Procédé pour la détection et/ou l'identification de circovirus MAP dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

5 a) mise en contact de l'échantillon biologique avec un polypeptide selon l'une des revendications 6 à 9, 22 et 24 ;

10 b) mise en évidence du complexe antigène-anticorps éventuellement formé.

31. Kit ou nécessaire pour la détection et/ou l'identification de circovirus MAP, caractérisé en ce qu'il comprend les éléments suivants :

15 a) un polypeptide selon l'une des revendications 6 à 9, 22 et 24 ;

b) le cas échéant, les réactifs pour la constitution du milieu propice à la réaction immunologique ;

20 c) les réactifs permettant mise en évidence des complexes antigène-anticorps éventuellement formés entre le ou les polypeptides de l'invention et les anticorps ;

d) le cas échéant, un échantillon biologique de référence (témoin négatif) dépourvu d'anticorps reconnus par ledit polypeptide ;

25 e) le cas échéant, un échantillon biologique de référence (témoin positif) contenant une quantité prédéterminée d'anticorps reconnus par ledit polypeptide.

30 32. Anticorps mono- ou polyclonaux, leurs fragments, ou anticorps chimériques, caractérisés en ce qu'ils sont capables de reconnaître spécifiquement un polypeptide selon l'une des revendications 6 à 9, 22 et 24.

35 33. Anticorps selon la revendication 32, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un anticorps marqué.

34. Procédé pour la détection et/ou l'identification de circovirus MAP dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
a) mise en contact de l'échantillon biologique avec un anticorps selon l'une des revendications 32 ou 33 ;
5 b) mise en évidence du complexe antigène-anticorps formé.

35. Kit ou nécessaire pour la détection et/ou l'identification de circovirus MAP, caractérisé en ce qu'il comprend les éléments suivants :
10 a) un anticorps polyclonal ou monoclonal selon l'une des revendications 32 ou 33 ;
b) le cas échéant, les réactifs pour la constitution du milieu propice à la réaction immunologique ;
15 c) les réactifs permettant la mise en évidence des complexes antigène-anticorps produits par la réaction immunologique.

36. Procédé de détection et/ou d'identification de circovirus MAP dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il met en oeuvre une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 11 à 15.

37. Procédé selon la revendication 36, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes :
25 a) le cas échéant, isolement de l'ADN à partir de l'échantillon biologique à analyser ;
b) amplification spécifique de l'ADN de circovirus MAP à l'aide d'au moins une amorce selon l'une des revendications 11 à 15 ;
30 c) mise en évidence des produits d'amplification.

38. Procédé selon la revendication 36, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
35 a) mise en contact d'une sonde nucléotidique selon l'une des revendications 11 à 15 avec un échantillon biologique, l'ADN contenu dans l'échantillon biologique

ayant, le cas échéant, préalablement été rendu accessible à l'hybridation, dans des conditions permettant l'hybridation de la sonde à l'ADN de l'échantillon ;

5 b) mise en évidence de l'hybride éventuellement formé entre la sonde nucléotidique et l'ADN de l'échantillon biologique.

39. Procédé selon la revendication 36, caractérisé en
10 ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) mise en contact d'une sonde nucléotidique immobilisée sur un support selon la revendication 14, avec un échantillon biologique, l'ADN de l'échantillon, ayant, le cas échéant, été préalablement rendu accessible à
15 l'hybridation, dans des conditions permettant l'hybridation de la sonde à l'ADN de l'échantillon ;
b) mise en contact de l'hybride formé entre la sonde nucléotidique immobilisée sur un support et l'ADN contenu dans l'échantillon biologique, le cas échéant après élimination de l'ADN de l'échantillon biologique n'ayant pas hybridé avec la sonde, avec une sonde nucléotidique marquée selon la revendication 13 ;
c) mise en évidence du nouvel hybride formé à l'étape b).

25 40. Procédé selon la revendication 39, caractérisé en ce que, préalablement à l'étape a), l'ADN de l'échantillon biologique, est amplifié à l'aide d'au moins une amorce selon l'une des revendications 11 à 15..

30 41. Kit ou nécessaire pour la détection et/ou l'identification de circovirus MAP associé, caractérisé en ce qu'il comprend les éléments suivants :

a) une sonde nucléotidique selon l'une des revendications 11 à 15 ;
35 b) le cas échéant, les réactifs nécessaires à la mise en œuvre d'une réaction d'hybridation ;

c) le cas échéant, au moins une amorce selon l'une des revendications 11 à 15, ainsi que les réactifs nécessaires à une réaction d'amplification de l'ADN.

5 42. Kit ou nécessaire pour la détection et/ou l'identification de circovirus MAP, caractérisé en ce qu'il comprend les éléments suivants :

- a) une sonde nucléotidique, dite sonde de capture, selon la revendication 14 ;
- 10 b) une sonde oligonucléotidique, dite sonde de révélation, selon la revendication 13 ;
- c) le cas échéant, au moins une amorce selon l'une des revendications 11 à 15, ainsi que les réactifs nécessaires à une réaction d'amplification de l'ADN.

15 43. Kit ou nécessaire pour la détection et/ou l'identification de circovirus MAP, caractérisé en ce qu'il comprend les éléments suivants :

- a) au moins une amorce selon l'une des revendications 11 à 15 ;
- b) le cas échéant, les réactifs nécessaires pour effectuer une réaction d'amplification d'ADN ;
- 20 c) le cas échéant, un composant permettant de vérifier la séquence du fragment amplifié, plus particulièrement une sonde oligonucléotidique selon l'une des revendications 11 à 15.

30 44. Procédé ou kit ou nécessaire selon l'une des revendications 30 à 43, pour le diagnostic d'une infection par le circovirus MAP.

35 45. Utilisation d'une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 1 à 5, et 10, d'un polypeptide selon l'une des revendications 6 à 9, 22 et 24, d'un anticorps selon l'une des revendications 32 et 33, d'une cellule selon la revendication 19, et/ou d'un animal transformé selon la revendication 20, pour la sélection de

composés organiques ou inorganiques capables de moduler, d'induire ou d'inhiber l'expression de gènes, et/ou de modifier la réPLICATION cellulaire du circovirus MAP ou capable d'induire ou d'inhiber chez le porc les pathologies liées à une infection par le circovirus MAP.

46. Méthode de sélection de composé capable de se lier à un polypeptide selon l'une des revendications 6 à 9, 22 et 24, capable de se lier à une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 1 à 5, et 10, ou capable de reconnaître un anticorps selon la revendication 32, et/ou capable de moduler, d'induire ou d'inhiber l'expression de gènes, et/ou de modifier la réPLICATION cellulaire du circovirus MAP, ou capable d'induire ou d'inhiber chez le porc les pathologies liées à une infection par le circovirus MAP, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

- a) mise en contact dudit composé avec ledit polypeptide, ladite séquence nucléotidique, avec une cellule transformée selon la revendication 19, et/ou administration dudit composé à un animal transformé selon la revendication 20 ;
- b) détermination de l'activité dudit composé.

47. Composé susceptible d'être sélectionné par une méthode selon la revendication 46.

48. Composition pharmaceutique comprenant un composé choisi parmi les composés suivants :

- a) une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 1 à 5, et 10 ;
- b) un polypeptide selon l'une des revendications 6 à 9, 22, 24 à 26, et 29 ;
- c) un vecteur ou une particule virale selon l'une des revendications 16 à 18, et 28, ou une cellule selon la revendication 19 ;
- d) un anticorps selon la revendication 32 ; et
- e) un composé selon la revendication 47.

49. Composition selon la revendication 48, éventuellement en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

5

50. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 48 et 49 pour la prévention ou le traitement d'une infection par le circovirus MAP.

10 51. Composition vaccinale, caractérisée en ce qu'elle comprend un ou plusieurs polypeptides selon l'une des revendications 6 à 9, 22 et 24 et/ou un ou plusieurs polypeptides hybrides selon l'une des revendications 25, 26 et 29.

15

52. Utilisation d'une cellule selon la revendication 19, pour la préparation d'une composition vaccinale.

20 53. Composition vaccinale, caractérisée en ce qu'elle contient une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 1 à 5, 10 et 27, un vecteur selon l'une des revendications 16, 17 et 28, et/ou une cellule selon revendication 19.

25 54. Composition vaccinale selon l'une des revendications 51 et 53, pour la prévention ou le traitement d'une infection par le circovirus MAP.

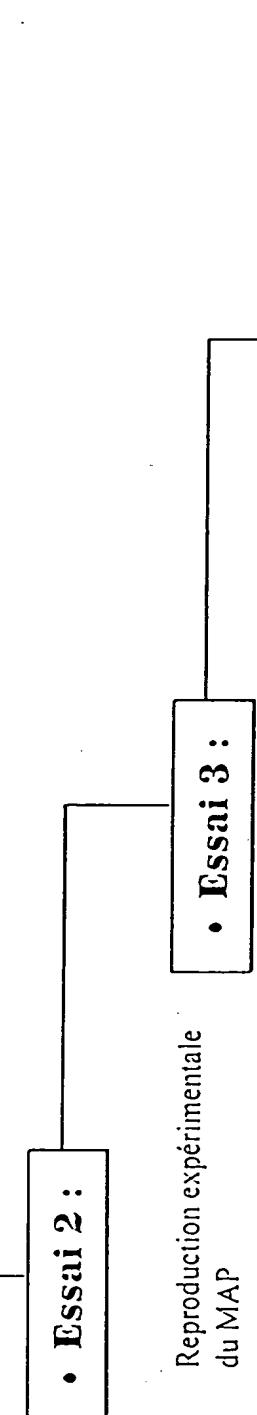
30 55. Composition vaccinale selon l'une des revendications 51, 53 et 54, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable et, le cas échéant, un ou plusieurs adjuvants de l'immunité appropriés.

35 56. Vecteur selon la revendication 17, particule virale selon la revendication 18, ou cellule selon la revendication 19, pour le traitement et/ou la prévention d'une maladie par thérapie génique.

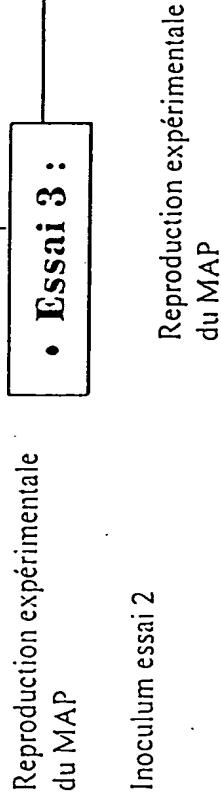
57. Composition pharmaceutique comprenant à titre d'agent thérapeutique ou prophylactique, un vecteur selon la revendication 17, une particule virale selon la revendication 18 ou une cellule selon la revendication 19.

Reproduction expérimentale du MAP par inoculation de broyats d'organes de porcs d'élevages atteints de MAP

• ESSAI 2 :



• ESSAI 3 :



→ Préparation de broyats d'organe

- Visualisation en microscopie électronique d'un virus apparenté à un circovirus

® Production d'un antisérum spécifique du MAP

- Mise en culture *in vitro* d'un agent réagissant avec l'antisérum MAP

Inoculum essai 2

Inoculum essai 2

Reproduction expérimentale du MAP

○ Préparation de broyats d'organes

Inoculum essai 3

Pas de reproduction expérimentale du MAP

± Clonage du circovirus associé au MAP

Inoculum essai 4

2 Séroconversion des porcs contre la protéine REP du circovirus associé au MAP

FIGURE 1

10 20 30 40 50 60
 ACCAGCGCAC TTCGGCAGCG GCAGCACCTC GGCAGCGTCA GTGAAAATGC CAAGCAAGAA
 70 80 90 100 110 120
 AAGCGGCCCG CAACCCCCATA AGAGGTGGGT GTTCACCCCTT AATAATCCTT CCGAGGAGGA
 130 140 150 160 170 180
 GAAAAACAAA ATACGGGAGC TTCCAATCTC CCTTTTGAT TATTTTGTGTT GTGGCGAGGA
 190 200 210 220 230 240
 AGGTTTGGAA GAGGGTAGAA CTCCTCACCT CCAGGGGTTT GCGAATTTTG CTAAGAAGCA
 250 260 270 280 290 300
 GACTTTAAC AAGGTGAAGT GGTATTTGG TGCCCGCTGC CACATCGAGA AAGCGAAAGG
 310 320 330 340 350 360
 AACCGACCAG CAGAATAAAG AATACTGCAG TAAAGAAGGC CACATACTTA TCGAGTGTGG
 370 380 390 400 410 420
 AGCTCCGCGG AACCAAGGGGA AGCGCAGCGA CCTGTCTACT GCTGTGAGTA CCCTTTGGGA
 430 440 450 460 470 480
 GACGGGGTCT TTGGTGACTG TAGCCGAGCA GTTCCCTGTA ACGTATGTGA GAAATTCCG
 490 500 510 520 530 540
 CGGGCTGGCT GAACCTTTGA AAGTGAGCGG GAAGATGCAG CAGCGTGATT GGAAGACAGC
 550 560 570 580 590 600
 TGTACACGTC ATAGTGGGCC CGCCCGGTTG TGGGAAGAGC CAGTGGGCC CTAATTGTC
 610 620 630 640 650 660
 TGAGCCTAGG GACACCTACT GGAAGCCTAG TAGAAATAAG TGGTGGGATG GATATCATGG
 670 680 690 700 710 720
 AGAAGAAGTT GTTGTGTTGG ATGATTTTA TGGCTGGTTA CCTTGGGATG ATCTACTGAG
 730 740 750 760 770 780
 ACTGTGTGAC CGGTATCCAT TGACTGTAGA GACTAAAGGG GGTACTGTTC CTTTTTGGC
 790 800 810 820 830 840
 CCGCAGTATT TTGATTACCA GCAATCAGGC CCCCCAGGAA TGGTACTCCT CAACTGCTGT
 850 860 870 880 890 900
 CCCAGCTGTA GAAGCTCTCT ATCGGAGGAT TACTACTTG CAATTTGGA AGACTGCTGG

FIGURE 2

910 920 930 940 950 960
 AGAACAAATCC ACGGAGGTAC CCGAAGGCCG ATTTGAAGCA GTGGACCCAC CCTGTGCCCT
 970 980 990 1000 1010 1020
 TTTCCCCATAT AAAATAAATT ACTGAGTCTT TTTTGTATC ACATCGTAAT GGTTTTTATT
 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 TTTATTTCATT TAGAGGGTCT TTCAGGATAA ATTCTCTGAA TTGTACATAA ATAGTCAACC
 1090 1100 1110 1120 1130 1140
 TTACACACATA ATTTTGGGCT GTGGTTGCAT TTTGGAGCGC ATAGCCCAGG CCTGTGTGCT
 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 CGACATTGGT GTGGGTATTT AAATGGAGCC ACAGCTGGTT TCTTTTATTA TTTGGCTGGA
 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 ACCAACATCAAT TGTTTGGTCT AGCTCTGGTT TGGGGGTGAA GTACCTGGAG TGGTAGGTAA
 1270 1280 1290 1300 1310 1320
 AGGGCTGCCT TATGGTGTGG CGGGAGGAGT AGTTAATATA GGGGTCAATAG GCCAAGTTGG
 1330 1340 1350 1360 1370 1380
 TGGAGGGGGT TACAAAGTTG GCATCCAAGA TAACAACAGT GGACCCAACA CCTCTTGAT
 1390 1400 1410 1420 1430 1440
 TAGAGGTGAT GGGGTCTCTG GGGTAAAATT CATATTTAGC CTTTCTAATA CGGTAGTATT
 1450 1460 1470 1480 1490 1500
 GGAAAGGTAG GGGTAGGGGG TTGGTGCCTGC CTGAGGGGGG GAGGAACCTGG CCGATGTTGA
 1510 1520 1530 1540 1550 1560
 ATCTCAGCTC GTTAACATTC CAAGATGGCT GCGAGTGTCC TCCTCTTATG GTGAGTACAA
 1570 1580 1590 1600 1610 1620
 ATTCTCTAGA AAGGCAGGAA TTGAAGATAC CCGTCTTCG GCGCCATCTG TAACGGTTTC
 1630 1640 1650 1660 1670 1680
 TGAAGGCAGGG GTGTACCAAA TATGGTCTTC TCCGGAGGAT GTTTCCAAGA TGGCTGCAGG
 1690 1700 1710 1720 1730 1740
 GGCAGGGTCCG TCTTCTGCAGG TAACGCCCTCC TTGGCCACGT CATCCTATAA AAGTGAAAGA
 1750 1760 1770 1780 1790 1800
 AGTGCAGCTGC TGTAGTATT.

FIGURE 2 (suite)

Leu Ala Ser Arg Cys Arg Cys Cys Arg Pro Leu Thr Leu Ser Phe Ala Leu Cys
 Trp Arg Val Glu Ala Ala Ala Gly Arg Cys Arg *** His Phe His Trp Ala
 Gly Ala Cys Lys Pro Leu Pro Leu Val Glu Ala Ala Asp Thr Phe Ile Gly Leu

 3' TGG TCG CGT GAA GCC GTC GCC GTC GTG GAG CCG TCG CAG TCA CTT TTA CGG TTC
 9 18 27 36 45 54
 5' ACC AGC GCA CTT CGG CAG CGG CAG CAC CTC GGC AGC GTC AGT GAA AAT GCC AAG

 Thr Ser Ala Leu Arg Gln Arg Gln His Leu Gly Ser Val Ser Glu Asn Ala Lys
 Pro Ala His Phe Gly Ser Gly Ser Thr Ser Ala Ala Ser Val Lys Met Pro Ser
 Gln Arg Thr Ser Ala Ala Ala Pro Arg Gln Arg *** Lys Cys Gln Ala

 Ser Phe Arg Gly Ala Val Gly Tyr Ser Thr Pro Thr *** Gly *** Tyr Asp Lys
 Leu Phe Ala Ala Arg Leu Gly Met Leu Pro Pro His Glu Gly Lys Ile Ile Arg
 Leu Phe Leu Pro Gly Cys Gly Trp Leu Leu His Thr Asn Val Arg Leu Leu Gly

 GTT CTT TTC GCC GGG CGT TGG GGT ATT CTC CAC CCA CAA GTG GGA ATT ATT AGG
 63 72 81 90 99 108
 CAA GAA AAG CGG CCC GCA ACC CCA TAA GAG GTG GGT GTT CAC CCT TAA TAA TCC

 Gln Glu Lys Arg Pro Ala Thr Pro *** Glu Val Gly Val His Pro *** *** Ser
 Lys Lys Ser Gly Pro Gln Pro His Lys Arg Trp Val Phe Thr Leu Asn Asn Pro
 Arg Lys Ala Ala Arg Asn Pro Ile Arg Gly Gly Cys Ser Pro Leu Ile Leu

 Arg Pro Pro Ser Phe Cys Phe Val Pro Ala Glu Leu Arg Gly Lys Gln Asn Asn
 Gly Leu Leu Leu Phe Val Phe Tyr Pro Leu Lys Trp Asp Gly Lys Lys Ile Ile
 Glu Ser Ser Phe Phe Leu Ile Arg Ser Ser Gly Ile Glu Arg Lys Ser ***

 AAG GCT CCT CTT TTT GTT TTA TGC CCT CGA AGG TTA GAG GGA AAA ACT AAT
 117 126 135 144 153 162
 TTC CGA GGA GGA GAA AAA CAA AAT ACG GGA GCT TCC AAT CTC CCT TTT TGA TTA

 Phe Arg Gly Gly Glu Lys Gln Asn Thr Gly Ala Ser Asn Leu Pro Phe *** Leu
 Ser Glu Glu Glu Lys Asn Lys Ile Arg Glu Leu Pro Ile Ser Leu Phe Asp Tyr
 Pro Arg Arg Arg Lys Thr Lys Tyr Gly Ser Phe Gln Ser Pro Phe Leu Ile Ile

 Gln Lys His Arg Pro Leu Asn Pro Leu Pro Tyr Phe Glu Glu Gly Pro Thr
 Lys Asn Thr Ala Leu Phe Thr Gln Phe Leu Thr Ser Ser Arg Val Glu Leu Pro
 Lys Thr Gln Pro Ser Ser Pro Lys Ser Pro Leu Val Gly *** Arg Trp Pro

 AAA ACA AAC ACC GCT CCT TCC AAA CCT TCT CCC ATC TTG AGG AGT GGA GGT CCC
 171 180 189 198 207 216
 TTT TGT TTG TGG CGA GGA AGG TTT GGA AGA GGG TAG AAC TCC TCA CCT CCA GGG

 Phe Cys Leu Trp Arg Gly Arg Phe Gly Arg Gly *** Asn Ser Ser Pro Pro Gly
 Phe Val Cys Gly Glu Glu Gly Leu Glu Glu Gly Arg Thr Pro His Leu Gln Gly
 Leu Phe Val Ala Arg Lys Val Trp Lys Arg Val Glu Leu Leu Thr Ser Arg Gly

 Gln Ser Asn Gln *** Ser Ala Ser Lys *** Cys Pro Ser Thr Thr Asn Gln His
 Lys Arg Ile Lys Ser Leu Leu Ser Lys Val Leu His Leu Pro Ile Lys Thr
 Asn Ala Phe Lys Ala Leu Phe Cys Val Lys Leu Leu Thr Phe His Tyr Lys Pro

 CAA ACG CTT AAA ACG ATT CTT CGT CTG AAA ATT GTT CCA CTT CAC CAT AAA ACC
 225 234 243 252 261 270
 GTT TGC GAA TTT TGC TAA GAA GCA GAC TTT TAA CAA GGT GAA GTG GTA TTT TGG

 Val Cys Glu Phe Cys *** Glu Ala Asp Phe *** Gln Gly Glu Val Val Phe Trp
 Phe Ala Asn Phe Ala Lys Lys Gln Thr Phe Asn Lys Val Lys Trp Tyr Phe Gly
 Leu Arg Ile Leu Leu Arg Ser Arg Leu Leu Thr Arg *** Ser Gly Ile Leu Val

Gly Ser Gly Cys Arg Ser Leu Ser Leu Phe Arg Gly Ala Ser Tyr Leu Ile Ser
 Gly Ala Ala Val Asp Leu Phe Arg Phe Ser Gly Val Leu Leu Ile Phe Phe Val
 Ala Arg Gln Trp Met Ser Phe Ala Phe Pro Val Ser Trp Cys Phe Leu Ser Tyr

 ACG GGC GAC GGT GTA GCT CTT TCG CTT TCC TTG GCT GGT CGT CTT ATT TCT TAT
 279 288 297 306 315 324
 TGC CCG CTG CCA CAT CGA GAA AGC GAA AGG AAC CGA CCA GCA GAA TAA AGA ATA

 Cys Pro Leu Pro His Arg Glu Ser Glu Arg Asn Arg Pro Ala Glu *** Arg Ile
 Ala Arg Cys His Ile Glu Lys Ala Lys Gly Thr Asp Gln Gln Asn Lys Glu Tyr
 Pro Ala Ala Thr Ser Arg Lys Arg Lys Glu Pro Thr Ser Arg Ile Lys Asn Thr

 Cys Tyr Leu Leu Gly Cys Val *** Arg Thr His Leu Glu Ala Ser Gly Pro Ser
 Ala Thr Phe Phe Ala Val Tyr Lys Asp Leu Thr Ser Ser Arg Pro Val Leu Pro
 Gln Leu Leu Ser Pro Trp Met Ser Ile Ser His Pro Ala Gly Arg Phe Trp Pro

 GAC GTC ATT TCT TCC GGT GTA TGA ATA GCT CAC ACC TCG AGG CGC CTT GGT CCC
 333 342 351 360 369 378
 CTG CAG TAA AGA AGG CCA CAT ACT TAT CGA GTG TGG AGC TCC GCG GAA CCA GGG

 Leu Gln *** Arg Arg Pro His Thr Tyr Arg Val Trp Ser Ser Ala Glu Pro Gly
 Cys Ser Lys Glu Gly His Ile Leu Ile Glu Cys Gly Ala Pro Arg Asn Gln Gly
 Ala Val Lys Lys Ala Thr Tyr Leu Ser Ser Val Glu Leu Arg Gly Thr Arg Gly

 Ala Cys Arg Gly Thr *** Gln Gln Ser Tyr Gly Lys Pro Ser Pro Thr Lys Pro
 Leu Ala Ala Val Gln Arg Ser Ser His Thr Gly Lys Gln Leu Arg Pro Arg Gln
 Phe Arg Leu Ser Arg Asp Val Ala Thr Leu Val Arg Lys Ser Val Pro Asp Lys

 CTT CGC GTC GCT GGA CAG ATG ACG ACA CTC ATG GGA AAA CCT CTG CCC CAG AAA
 387 396 405 414 423 432
 GAA GCG CAG CGA CCT GTC TAC TGC TGT GAG TAC CCT TTT GGA GAC GGG GTC TTT

 Glu Ala Gln Arg Pro Val Tyr Cys Cys Glu Tyr Pro Phe Gly Asp Gly Val Phe
 Lys Arg Ser Asp Leu Ser Thr Ala Val Ser Thr Leu Leu Glu Thr Gly Ser Leu
 Ser Ala Ala Thr Cys Leu Leu *** Val Pro Phe Trp Arg Arg Gly Leu Trp

 Ser Gln Leu Arg Ala Thr Glu Gln Leu Thr His Ser Phe Asn Gly Arg Ala Pro
 His Ser Tyr Gly Leu Leu Lys Arg Tyr Arg Ile His Ser Ile Glu Ala Pro Gln
 Thr Val Thr Ala Ser Cys Asn Gly Thr Val Tyr Thr Leu Phe Lys Arg Pro Ser

 CCA CTG ACA TCG GCT CGT CAA AGG ACA TTG CAT ACA CTC TTT AAA GGC GCC CGA
 441 450 459 468 477 486
 GGT GAC TGT AGC CGA GCA GTT TCC TGT AAC GTA TGT GAG AAA TTT CCG CGG GCT

 Gly Asp Cys Ser Arg Ala Val Ser Cys Asn Val Cys Glu Lys Phe Pro Arg Ala
 Val Thr Val Ala Glu Gln Phe Pro Val Thr Tyr Val Arg Asn Phe Arg Gly Leu
 *** Leu *** Pro Ser Ser Phe Leu *** Arg Met *** Glu Ile Ser Ala Gly Trp

 Gln Val Lys Ser Leu Ser Arg Ser Ser Ala Ala His Asn Ser Ser Leu Gln
 Ser Phe Lys Gln Phe His Ala Pro Leu His Leu Leu Thr Ile Pro Leu Cys Ser
 Ala Ser Ser Lys Phe Thr Leu Pro Phe Ile Cys Cys Arg Ser Gln Phe Val Ala

 CCG ACT TGA AAA CTT TCA CTC GCC CTT CTA CGT CGT CGC ACT AAC CTT CTG TCG
 495 504 513 522 531 540
 GGC TGA ACT TTT GAA AGT GAG CGG GAA GAT GCA GCA GCG TGA TTG GAA GAC AGC

 Gly *** Thr Phe Glu Ser Glu Arg Glu Asp Ala Ala Ala *** Leu Glu Asp Ser
 Ala Glu Leu Leu Lys Val Ser Gly Lys Met Gln Gln Arg Asp Trp Lys Thr Ala
 Leu Asn Phe *** Lys *** Ala Gly Arg Cys Ser Ser Val Ile Gly Arg Gln Leu

Val Arg *** Leu Pro Gly Ala Arg Asn His Ser Ser Gly Thr Pro Gly Tyr Asn
 Tyr Val Asp Tyr His Ala Arg Gly Thr Thr Pro Leu Ala Leu Pro Gly Thr Ile
 Thr Cys Thr Met Thr Pro Gly Gly Pro Gln Pro Phe Leu Trp His Ala Arg Leu
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 ACA TGT GCA GTA TCA CCC GGG CGG GCC AAC ACC CTT CTC GGT CAC CCG GGC ATT
 549 558 567 576 585 594
 TGT ACA CGT CAT AGT GGG CCC GCC CGG TTG TGG GAA GAG CCA GTG GGC CCG TAA
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 Cys Thr Arg His Ser Gly Pro Ala Arg Leu Trp Glu Glu Pro Val Gly Pro ***
 Val His Val Ile Val Gly Pro Pro Gly Cys Gly Lys Ser Gln Trp Ala Arg Asn
 Tyr Thr Ser *** Trp Ala Arg Pro Val Val Gly Arg Ala Ser Gly Pro Val Ile
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 Gln Gln Ala *** Pro Cys Arg Ser Ser Ala *** Tyr Phe Tyr Thr Pro His
 Lys Ser Leu Arg Pro Val Gly Val Pro Leu Arg Thr Ser Ile Leu Pro Pro Ile
 Lys Ala Ser Gly Leu Ser Val *** Gln Phe Gly Leu Leu Phe Leu His His Ser
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 AAA ACG ACT CGG ATC CCT GTG GAT GAC CTT CGG ATC ATC TTT ATT CAC CAC CCT
 603 612 621 630 639 648
 TTT TGC TGA GCC TAG GGA CAC CTA CTG GAA GCC TAG TAG AAA TAA GTG GTG GGA
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 Phe Cys *** Ala *** Gly His Leu Leu Glu Ala *** *** Lys *** Val Val Gly
 Phe Ala Glu Pro Arg Asp Thr Tyr Trp Lys Pro Ser Arg Asn Lys Trp Trp Asp
 Leu Leu Ser Leu Gly Thr Pro Thr Gly Ser Leu Val Glu Ile Ser Gly Gly Met
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 Ile Asp His Leu Leu Gln Gln Lys Pro His Asn Lys His Ser Thr Val Lys
 Ser Ile Met Ser Phe Phe Asn Asn Asn Gln Ile Ile Lys Ile Ala Pro *** Arg
 Pro Tyr *** Pro Ser Ser Thr Thr Lys Ser Ser Lys *** Pro Gln Asn Gly
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 ACC TAT AGT ACC TCT TCT TCA ACA ACA AAA CCT ACT AAA AAT ACC GAC CAA TGG
 657 666 675 684 693 702
 TGG ATA TCA TGG AGA AGA AGT TGT TGT TTT GGA TGA TTT TTA TGG CTG GTT ACC
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 Trp Ile Ser Trp Arg Arg Ser Cys Cys Phe Gly *** Phe Leu Trp Leu Val Thr
 Gly Tyr His Gly Glu Glu Val Val Leu Asp Asp Phe Tyr Gly Trp Leu Pro
 Asp Ile Met Glu Lys Leu Leu Phe Trp Met Ile Phe Met Ala Gly Tyr Leu
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 Pro His Asp Val Ser Val Thr His Gly Thr Asp Met Ser Gln Leu Ser *** Leu
 Pro Ile Ile *** Gln Ser Gln Thr Val Pro Ile Trp Gln Ser Tyr Leu Ser Phe
 Gln Ser Ser Arg Ser Leu Ser His Ser Arg Tyr Gly Asn Val Thr Ser Val Leu
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 AAC CCT ACT AGA TGA CTC TGA CAC ACT GGC CAT AGG TAA CTG ACA TCT CTG ATT
 711 720 729 738 747 756
 TTG GGA TGA TCT ACT GAG ACT GTG TGA CCG GTA TCC ATT GAC TGT AGA GAC TAA
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 Leu Gly *** Ser Thr Glu Thr Val *** Pro Val Ser Ile Asp Cys Arg Asp ***
 Trp Asp Asp Leu Leu Arg Leu Cys Asp Arg Tyr Pro Leu Thr Val Glu Thr Lys
 Gly Met Ile Tyr *** Asp Cys Val Thr Gly Ile His *** Leu *** Arg Leu Lys
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 Pro Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Cys Tyr Lys Ser *** Trp Cys Asp Pro Gly
 Pro Thr Ser Asn Arg Lys Gln Gly Ala Thr Asn Gln Asn Gly Ala Ile Leu Gly
 Pro Pro Val Thr Gly Lys Lys Ala Arg Leu Ile Lys Ile Val Leu Leu *** Ala
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 TCC CCC ATG ACA AGG AAA AAA CCG GGC GTC ATA AAA CTA ATG GTC GTT AGT CCG
 765 774 783 792 801 810
 AGG GGG TAC TGT TCC TTT TTT GGC CCG CAG TAT TTT GAT TAC CAG CAA TCA GGC
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 Arg Gly Tyr Cys Ser Phe Phe Gly Pro Gln Tyr Phe Asp Tyr Gln Gln Ser Gly
 Gly Gly Thr Val Pro Phe Leu Ala Arg Ser Ile Leu Ile Thr Ser Asn Gln Ala
 Gly Val Leu Phe Leu Phe Trp Pro Ala Val Phe *** Leu Pro Ala Ile Arg Pro

Gly Pro Ile Thr Ser Arg Leu Gln Gln Gly Leu Gln Leu Leu Glu Arg Asp Ser
 Gly Leu Phe Pro Val Gly *** Ser Ser Asp Trp Ser Tyr Phe Ser Glu Ile Pro
 Gly Trp Ser His Tyr Glu Glu Val Ala Thr Gly Ala Thr Ser Ala Arg *** Arg

 GGG GGT CCT TAC CAT GAG GAG TTG ACG ACA GGG TCG ACA TCT TCG AGA GAT AGC
 819 828 837 846 855 864
 CCC CCA GGA ATG GTA CTC CTC AAC TGC TGT CCC AGC TGT AGA AGC TCT CTA TCG

 Pro Pro Gly Met Val Leu Leu Asn Cys Cys Pro Ser Cys Arg Ser Ser Leu Ser
 Pro Gln Glu Trp Tyr Ser Ser Thr Ala Val Pro Ala Val Glu Ala Leu Tyr Arg
 Pro Arg Asn Gly Thr Pro Gln Leu Leu Ser Gln Leu *** Lys Leu Ser Ile Gly

 Ser *** *** Lys Ala Ile Lys Ser Ser Gln Gln Leu Val Ile Trp Pro Pro Val
 Pro Asn Ser Ser Gln Leu Lys Pro Leu Ser Ser Phe Leu Gly Arg Leu Tyr
 Leu Ile Val Val Lys Cys Asn Gln Phe Val Ala Pro Ser Cys Asp Val Ser Thr

 CTC CTA ATG ATG AAA CGT TAA AAC CTT CTG ACG ACC TCT TGT TAG GTG CCT CCA
 873 882 891 900 909 918
 GAG GAT TAC TAC TTT GCA ATT TTG GAA GAC TGC TGG AGA ACA ATC CAC GGA GGT

 Glu Asp Tyr Tyr Phe Ala Ile Leu Glu Asp Cys Trp Arg Thr Ile His Gly Gly
 Arg Ile Thr Thr Leu Gln Phe Trp Lys Thr Ala Gly Glu Gln Ser Thr Glu Val
 Gly Leu Leu Leu Cys Asn Phe Gly Arg Leu Leu Glu Asn Asn Pro Arg Arg Tyr

 Arg Leu Gly Ile Gln Leu Leu Pro Gly Val Arg His Gly Lys Met Tyr Phe
 Gly Phe Ala Ser Lys Phe Cys His Val Trp Gly Thr Gly Lys Glu Trp Ile Phe
 Gly Ser Pro Arg Asn Ser Ala Thr Ser Gly Gly Gln Ala Arg Lys Gly Tyr Leu

 TGG GCT GGC TAA ACT TCG TCA CCT GGG TGG GAC ACG GGA AAA GGG TAT ATT
 927 936 945 954 963 972
 ACC CGA AGG CCG ATT TGA AGC AGT GGA CCC ACC CTG TGC CCT TTT CCC ATA TAA

 Thr Arg Arg Pro Ile *** Ser Ser Gly Pro Thr Leu Cys Pro Phe Pro Ile ***
 Pro Glu Gly Arg Phe Glu Ala Val Asp Pro Pro Cys Ala Leu Phe Pro Tyr Lys
 Pro Lys Ala Asp Leu Lys Gln Trp Thr His Pro Val Pro Phe Ser His Ile Lys

 Leu Asn Ser Leu Arg Lys Gln *** *** Met Thr Ile Thr Lys Ile Lys Ile ***
 Tyr Ile Val Ser Asp Lys Lys Asn Asp Cys Arg Leu Pro Lys *** Lys *** Glu
 Ile Phe *** Gln Thr Lys Lys Thr Ile Val Asp Tyr His Asn Lys Asn Lys ASN

 TTA TTT AAT GAC TCA GAA AAA ACA ATA GTG TAG CAT TAC CAA AAA TAA AAA TAA
 981 990 999 1008 1017 1026
 AAT AAA TTA CTG AGT CTT TGT TAT CAC ATC GTA ATG GTT TTT ATT TTT ATT

 Asn Lys Leu Leu Ser Leu Phe Cys Tyr His Ile Val Met Val Phe Ile Phe Ile
 Ile Asn Tyr *** Val Phe Phe Val Ile Thr Ser *** Trp Phe Leu Phe Leu Phe
 *** Ile Thr Glu Ser Phe Leu Leu Ser His Arg Asn Gly Phe Tyr Phe Tyr Ser

 Lys Ser Pro Arg Glu Pro Tyr Ile Arg Gln Ile Thr Cys Leu Tyr Asp Val Lys
 Asn Leu Pro Asp Lys Leu Ile Phe Glu Arg Phe Gln Val Tyr Ile Thr Leu Arg
 Met *** Leu Thr Lys *** Ser Leu Asn Glu Ser Asn Tyr Met Phe Leu *** Gly

 GTA AAT CTC CCA GAA AGT CCT ATT TAA GAG ACT TAA CAT GTA TTT ATC AGT TGG
 1035 1044 1053 1062 1071 1080
 CAT TTA GAG GGT CTT TCA GGA TAA ATT CTC TGA ATT GTA CAT AAA TAG TCA ACC

 His Leu Glu Gly Leu Ser Gly *** Ile Leu *** Ile Val His Lys *** Ser Thr
 Ile *** Arg Val Phe Gln Asp Lys Phe Ser Glu Leu Tyr Ile Asn Ser Gln Pro
 Phe Arg Gly Ser Phe Arg Ile Asn Ser Leu Asn Cys Thr *** Ile Val Asn Leu

Gly Cys Leu Lys Pro Ser His Asn Cys Lys Pro Ala Cys Leu Gly Pro Arg His
 Val Val Tyr Asn Gln Ala Thr Thr Ala Asn Gln Leu Ala Tyr Gly Leu Gly Thr
 *** Trp Met Ile Lys Pro Gln Pro Gln Met Lys Ser Arg Met Ala Trp Ala Gln
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 AAT GGT GTA TTA AAA CCC GAC ACC AAC GTA AAA CCT CGC GTA TCG GGT CCG GAC
 1089 1098 1107 1116 1125 1134
 TTA CCA CAT AAT TTT GGG CTG TGG TTG CAT TTT GGA GCG CAT AGC CCA GGC CTG
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 Leu Pro His Asn Phe Gly Leu Trp Leu His Phe Gly Ala His Ser Pro Gly Leu
 Tyr His Ile Ile Leu Gly Cys Gly Cys Ile Leu Glu Arg Ile Ala Gln Ala Cys
 Thr Thr *** Phe Trp Ala Val Val Ala Phe Trp Ser Ala *** Pro Arg Pro Val

 Ala Arg Cys Gln His Pro Tyr Lys Phe Pro Ala Val Ala Pro Lys Lys *** ***
 His Glu Val Asn Thr His Thr Asn Leu His Leu Trp Leu Gln Asn Arg Lys Asn
 Thr Ser Ser Met Pro Thr Pro Ile *** Ile Ser Gly Cys Ser Thr Glu Lys Ile
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 ACA CGA GCT GTA ACC ACA CCC ATA AAT TTA CCT CGG TGT CGA CCA AAG AAA ATA
 1143 1152 1161 1170 1179 1188
 TGT GCT CGA CAT TGG TGT GGG TAT TTA AAT GGA GCC ACA GCT GGT TTC TTT TAT
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 Cys Ala Arg His Trp Cys Gly Tyr Leu Asn Gly Ala Thr Ala Gly Phe Phe Tyr
 Val Leu Asp Ile Gly Val Gly Ile *** Met Glu Pro Gln Leu Val Ser Phe Ile
 Cys Ser Thr Leu Val Trp Val Phe Lys Trp Ser His Ser Trp Phe Leu Leu Leu

 Lys Ala Pro Val Leu *** Asn Asn Pro Arg Ala Arg Thr Gln Pro His Leu Val
 Asn Pro Gln Phe Trp Asp Ile Thr Gln Asp Leu Glu Pro Lys Pro Thr Phe Tyr
 Ile Gln Ser Ser Gly Ile Leu Gln Lys Thr *** Ser Gln Asn Pro Pro Ser Thr
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 ATA AAC CGA CCT TGG TTA GTT AAC AAA CCA GAT CGA GAC CAA ACC CCC ACT TCA
 1197 1206 1215 1224 1233 1242
 TAT TTG GCT GGA ACC AAT CAA TTG TTT GGT CTA GCT CTG GTT TGG GGG TGA AGT
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 Tyr Leu Ala Gly Thr Asn Gln Leu Phe Gly Leu Ala Leu Val Trp Gly *** Ser
 Ile Trp Leu Glu Pro Ile Asn Cys Leu Val *** Leu Trp Phe Gly Gly Glu Val
 Phe Gly Trp Asn Gln Ser Ile Val Trp Ser Ser Gly Leu Gly Val Lys Tyr

 Gln Leu Pro Leu Tyr Leu Ala Ala Lys His His Pro Pro Leu Leu Leu *** Tyr
 Arg Ser His Tyr Thr Phe Pro Gln Arg Ile Thr His Arg Ser Ser Tyr Asn Ile
 Gly Pro Thr Thr Pro Leu Pro Ser Gly *** Pro Thr Ala Pro Pro Thr Thr Leu
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 TGG ACC TCA CCA TCC ATT TCC CGA CGG AAT ACC ACA CCG CCC TCC TCA TCA ATT
 1251 1260 1269 1278 1287 1296
 ACC TGG AGT GGT AGG TAA AGG GCT GCC TTA TGG TGT GGC GGG AGG AGT AGT TAA
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 Thr Trp Ser Gly Arg *** Arg Ala Ala Leu Trp Cys Gly Gly Arg Ser Ser ***
 Pro Gly Val Val Gly Lys Gly Leu Pro Tyr Gly Val Ala Gly Gly Val Val Asn
 Leu Glu Trp *** Val Lys Gly Cys Leu Met Val Trp Arg Glu Glu *** Leu Ile

 Leu Pro *** Leu Gly Leu Gln His Leu Pro Asn Cys Leu Gln Cys Gly Leu Tyr
 Tyr Pro Asp Tyr Ala Leu Asn Thr Ser Pro Thr Val Phe Asn Ala Asp Leu Ile
 Ile Pro Thr Met Pro Trp Thr Pro Pro Pro *** Leu Thr Pro Met Trp Ser
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 ATA TCC CCA GTA TCC GGT TCA ACC ACC TCC CCC AAT GTT TCA ACC GTA GGT TCT
 1305 1314 1323 1332 1341 1350
 TAT AGG GGT CAT AGG CCA AGT TGG TGG AGG GGG TTA CAA AGT TGG CAT CCA AGA
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 Tyr Arg Gly His Arg Pro Ser Trp Trp Arg' Gly Leu Gln Ser Trp His Pro Arg
 Ile Gly Val Ile Gly Gln Val Gly Gly Gly Gly Tyr Lys Val Gly Ile Gln Asp
 *** Gly Ser *** Ala Lys Leu Val Glu Gly Val Thr Lys Leu Ala Ser Lys Ile

Cys Cys His Val Trp Cys Arg Lys Ser *** Leu His His Pro Arg Gln Pro Leu
 Val Val Thr Ser Gly Val Gly Arg Gln Asn Ser Thr Ile Pro Asp Arg Pro Tyr
 Leu Leu Leu Pro Gly Leu Val Glu Lys Ile Leu Pro Ser Pro Thr Glu Pro Thr

 ATT GTT GTC ACC TGG GTT GTG GAG AAA CTA ATC TCC ACT ACC CCA GAG ACC CCA
 1359 1368 1377 1386 1395 1404
 TAA CAA CAG TGG ACC CAA CAC CTC TTT GAT TAG AGG TGA TGG GGT CTC TGG GGT

 *** Gln Gln Trp Thr Gln His Leu Phe Asp *** Arg *** Trp Gly Leu Trp Gly
 Asn Asn Ser Gly Pro Asn Thr Ser Leu Ile Arg Gly Asp Gly Val Ser Gly Val
 Thr Thr Val Asp Pro Thr Pro Leu *** Leu Glu Val Met Gly Ser Leu Gly ***

 Ile *** Ile *** Gly Lys *** Tyr Pro Leu Ile Pro Phe Thr Pro Thr Pro Pro
 Phe Glu Tyr Lys Ala Lys Arg Ile Arg Tyr Tyr Gln Phe Pro Leu Pro Leu Pro
 Phe Asn Met Asn Leu Arg Glu Leu Val Thr Thr Asn Ser Leu Tyr Pro Tyr Pro

 TTT TAA GTA TAA ATC GGA AAG ATT ATG CCA TCA TAA CCT TTC CAT CCC CAT CCC
 1413 1422 1431 1440 1449 1458
 AAA ATT CAT ATT TAG CCT TTC TAA TAC GGT AGT ATT GGA AAG GTA GGG GTA GGG

 Lys Ile His Ile *** Pro Phe *** Tyr Gly Ser Ile Gly Lys Val Gly Val Gly
 Lys Phe Ile Phe Ser Leu Ser Asn Thr Val Val Leu Glu Arg *** Gly *** Gly
 Asn Ser Tyr Leu Ala Phe Leu Ile Arg *** Tyr Trp Lys Gly Arg Gly Arg Gly

 Gln His Arg Arg Leu Pro Pro Pro Val Pro Arg His Gln Ile Glu Ala Arg ***
 Asn Thr Gly Gly Ser Pro Pro Leu Phe Gln Gly Ile Asn Phe Arg Leu Glu Asn
 Thr Pro Ala Ala Gln Pro Pro Ser Ser Ala Ser Thr Ser Asp *** Ser Thr

 CCA ACC ACG GCG GAC TCC CCC CCT CCT TGA CCG GCT ACA ACT TAG AGT CGA GCA
 1467 1476 1485 1494 1503 1512
 GGT TGG TGC CGC CTG AGG GGG GGA ACT GGC CGA TGT TGA ATC TCA GCT CGT

 Gly Trp Cys Arg Leu Arg Gly Gly Thr Gly Arg Cys *** Ile Ser Ala Arg
 Val Gly Ala Ala *** Gly Gly Glu Glu Leu Ala Asp Val Glu Ser Gln Leu Val
 Leu Val Pro Pro Glu Gly Arg Asn Trp Pro Met Leu Asn Leu Ser Ser Leu

 Cys Glu Leu Ile Ala Ala Leu Thr Arg Arg Lys His His Thr Cys Ile Arg ***
 Val Asn Trp Ser Pro Gln Ser His Gly Gly Arg Ile Thr Leu Val Phe Glu Arg
 Leu Met Gly Leu His Ser Arg Thr Asp Glu Glu *** Pro Ser Tyr Leu Asn Glu

 ATT GTA AGG TTC TAC CGA CGC TCA CAG GAG GAG AAT ACC ACT CAT GTT TAA GAG
 1521 1530 1539 1548 1557 1566
 TAA CAT TCC AAG ATG GCT GCG AGT GTC CTC CTC TTA TGG TGA GTA CAA ATT CTC

 *** His Ser Lys Met Ala Ala Ser Val Leu Leu Leu Trp *** Val Gln Ile Leu
 Asn Ile Pro Arg Trp Leu Arg Val Ser Ser Tyr Gly Glu Tyr Lys Phe Ser
 Thr Phe Gln Asp Gly Cys Glu Cys Pro Pro Leu Met Val Ser Thr Asn Ser Leu

 Phe Pro Pro Phe Gln Leu Tyr Gly Asp Lys Pro Ala Met Gln Leu Pro Lys Gln
 Ser Leu Arg Ser Asn Phe Ile Gly Thr Lys Arg Arg Trp Arg Tyr Arg Asn Arg
 Leu Phe Ala Pro Ile Ser Ser Val Arg Arg Glu Ala Gly Asp Thr Val Thr Glu

 ATC TTT CCG CCC TTA ACT TCT ATG GGC AGA AAG CCG CGG TAG ACA TTG CCA AAG
 1575 1584 1593 1602 1611 1620
 TAG AAA GGC GGG AAT TGA AGA TAC CCG TCT TTC GGC GCC ATC TGT AAC GGT TTC

 *** Lys Gly Gly Asn *** Arg Tyr Pro Ser Phe Gly Ala Ile Cys Asn Gly Phe
 Arg Lys Ala Gly Ile Glu Asp Thr Arg Leu Ser Ala Pro Ser Val Thr Val Ser
 Glu Arg Arg Glu Leu Lys Ile Pro Val Phe Arg Arg His Leu *** Arg Phe Leu

Leu Arg Pro Thr Gly Phe Ile Thr Lys Glu Pro Pro His Lys Trp Ser Pro Gln
 Phe Ala Pro His Val Leu Tyr Pro Arg Arg Arg Leu Ile Asn Gly Leu His Ser
 Ser Pro Pro Thr Tyr Trp Ile His Asp Glu Gly Ser Ser Thr Glu Leu Ile Ala

 ACT TCC GCC CCA CAT GGT TTA TAC CAG AAG AGG CCT CCT ACA AAG GTT CTA CCG
 1629 1638 1647 1656 1665 1674
 TGA AGG CGG GGT GTA CCA AAT ATG GTC TTC TCC GGA GGA TGT TTC CAA GAT GGC

 *** Arg Arg Gly Val Pro Asn Met Val Phe Ser Gly Gly Cys Phe Gln Asp Gly
 Glu Gly Gly Val Tyr Gln Ile Trp Ser Ser Pro Glu Asp Val Ser Lys Met Ala
 Lys Ala Gly Cys Thr Lys Tyr Gly Leu Leu Arg Arg Met Phe Pro Arg Trp Leu

 Pro Pro Pro Asp Thr Lys Gln Pro Leu Ala Glu Lys Ala Val Asp Asp *** Leu
 Arg Pro Arg Thr Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Pro Trp Thr Met Arg Tyr
 Ala Pro Ala Pro Gly Asp Glu Ala Thr Val Gly Gly Gln Gly Arg *** Gly Ile

 ACG CCC CCG CCC AGG CAG AAG ACG CCA TTG CGG AGG AAC CGG TGC AGT AGG ATA
 1683 1692 1701 1710 1719 1728
 TGC GGG GGC GGG TCC GTC TTC TGC GGT AAC GCC TCC TTG GCC ACG TCA TCC TAT

 Cys Gly Gly Ser Val Phe Cys Gly Asn Ala Ser Leu Ala Thr Ser Ser Tyr
 Ala Gly Ala Gly Pro Ser Ser Ala Val Thr Pro Pro Trp Pro Arg His Pro Ile
 Arg Gly Arg Val Arg Leu Leu Arg *** Arg Leu Leu Gly His Val Ile Leu ***

Leu Ser Leu Leu Ala Ser Ser Tyr Tyr
 Phe His Phe His Ala Ala Thr Thr Asn
 Phe Thr Phe Ser Thr Arg Gln Gln Leu Ile

 TTT TCA CTT TCT TCA CGC GAC GAC ATC ATA A S'
 1737 1746 1755
 AAA AGT GAA AGA AGT GCG CTG CTG TAG TAT T 3'

 Lys Ser Glu Arg Ser Ala Leu Leu *** Tyr
 Lys Val Lys Glu Val Arg Cys Cys Ser Ile
 Lys *** Lys Lys Cys Ala Ala Val Val

11/17

10 20 30 40 50 60
MPSKKSGPQP HKRWVFTLNN PSEEENKIR ELPISLFDYF VCGEEGLEEG RTPHLQGFAN
70 80 90 100 110 120
FAKKQTFNKV KWYFGARCHI EAKAGTDQQN KEYCSKEGHI LIECGAPRNQ GKRSDLSTAV
130 140 150 160 170 180
STLLETGSLV TVAEQFPVTY VRNFRGLAEL LKVSGKMQR DWKTAVHVIV GPPGCGK\$QW
190 200 210 220 230 240
ARNFAEPRDT YWKPSRNKWW DGYHGEEVVV LDDFYGWLW DDLLRLCDRY PLTVETKGHT
250 260 270 280 290 300
VPFLARSILI TSNQAPQEWEY SSTAVPAVEA LYRRITTLQF WKTAGEQSTE VPEGRFEAVD
310 320 330 340 350 360
PPCALFPYKI NY*.....

FIGURE 4

10 20 30 40 50 60
MTWPRRRYRR RRTRPRSHLG NILRRRPyLV HPAFRNRYRW RRKTGIFNSR LSREFVLTIR
70 80 90 100 110 120
GGHSQPSWNV NELRFNIGQF LPPSGGTNPL PLPFQYYRIR KAKYEFYPRD PITSNQRGVG
130 140 150 160 170 180
STVVILDANF VTPSTNLAYD PYINYSSRHT IRQPFTYHSR YFTPKELDQ TIDWFQPNNK
190 200 210 220 230 240
RNQLWLHLNT HTNVEHTGLG YALQNATTAQ NYVVRLTIYV QFREFILKDP LNE*.....

FIGURE 5

10 20 30 40 50 60
MISIPPLIST RLPVGVPRLS KITGPLALPT TGRAHYDVYS CLPITLLHLP AHFQKFSQPA
70 80 90 100 110 120
EISHIRYRKL LGYSHQRPRRL QKGTHSSRQV AALPLVPRSS TLDKYVAFFT AVFFILLVGS
130 140 150 160 170 180
FRFLDVAAGT KIPLHLVKSL LLSKIRKPLE VRSSTLFQTF LATNKIIKKG DWKLPHYFVFL
190 200 210 220 230 240
LLGRIIKGEH PPLMGLRAAF LAWHFH.....

CABINET RECUMBLEAU

ORIGINAL

FIGURE 6

		10	20	30	40	50	
circopormank	1	ACCAGCGCAC	TTCGGCAGCG	GCAGCACCTC	GGCAGCGTCA	GTGAAAATGC	50
circopormeeh	1	ACCAGCGCAC	TTCGGCAGCG	GCAGCACCTC	GGCAGCGTCA	GTGAAAATGC	50
circopordfp	1	ACCAGCGCAC	TTCGGCAGCG	GCAGCACCTC	GGCAGCGTCA	GTGAAAATGC	50
		60	70	80	90	100	
circopormank	51	CAAGCAAGAA	AAGCGGGCCC	CAACCCCAT	AGAGGTGGGT	TTTCAACCTT	100
circopormeeh	51	CAAGCAAGAA	AAGCGGGCCC	CAACCCCAT	AGAGGTGGGT	TTTCAACCTT	100
circopordfp	51	CAAGCAAGAA	AAGCGGGCCC	CAACCCCAT	AGAGGTGGGT	TTTCAACCTT	100
		110	120	130	140	150	
circopormank	101	AATAATCCTT	CCGAGGAGGA	GAAAAACAAA	ATACGGGAGC	TTCCAATCTC	150
circopormeeh	101	AATAATCCTT	CCGAGGAGGA	GAAAAACAAA	ATACGGGAGC	TTCCAATCTC	150
circopordfp	101	AATAATCCTT	CCGAGGAGGA	GAAAAACAAA	ATACGGGAGC	TTCCAATCTC	150
		160	170	180	190	200	
circopormank	151	CCTTTTGAT	TATTTTGT	GCGGAGAGGA	AGGTTTGGAA	GAGGGTAGAA	200
circopormeeh	151	CCTTTTGAT	TATTTTGT	GCGGAGAGGA	AGGTTTGGAA	GAGGGTAGAA	200
circopordfp	151	CCTTTTGAT	TATTTTGT	GCGGAGAGGA	AGGTTTGGAA	GAGGGTAGAA	200
		210	220	230	240	250	
circopormank	201	CTGCTCACCT	CCAGGGTTT	GCTAATTTTG	CTAAGAAC	GACTTTAAC	250
circopormeeh	201	CTCCTCACCT	CCAGGGTTT	GCGAATTTTG	CTAAGAAC	GACTTTAAC	250
circopordfp	201	CTCCTCACCT	CCAGGGTTT	GCGAATTTTG	CTAAGAAC	GACTTTAAC	250
		260	270	280	290	300	
circopormank	251	AAGGTGAAGT	GGTATTTTG	TGCCCGCTGC	CACATCGAGA	AAGCGAAAGG	300
circopormeeh	251	AAGGTGAAGT	GGTATTTTG	TGCCCGCTGC	CACATCGAGA	AAGCGAAAGG	300
circopordfp	251	AAGGTGAAGT	GGTATTTTG	TGCCCGCTGC	CACATCGAGA	AAGCGAAAGG	300
		310	320	330	340	350	
circopormank	301	AACCGACCAG	CAGAATAAAG	AATACTGCAG	TAAAGAAC	CACATACTTA	350
circopormeeh	301	AACCGACCAG	CAGAATAAAG	AATACTGCAG	TAAAGAAC	CACATACTTA	350
circopordfp	301	AACCGACCAG	CAGAATAAAG	AATACTGCAG	TAAAGAAC	CACATACTTA	350
		360	370	380	390	400	
circopormank	351	TCGAGTGTGG	AGCTCCGG	AACCAGGGGA	AGCGCAGCGA	CCTGTCTACT	400
circopormeeh	351	TCGAGTGTGG	AGCTCCGG	AACCAGGGGA	AGCGCAGCGA	CCTGTCTACT	400
circopordfp	351	TCGAGTGTGG	AGCTCCGG	AACCAGGGGA	AGCGCAGCGA	CCTGTCTACT	400
		410	420	430	440	450	
circopormank	401	GCTGTGAGTA	CCCTTTGGA	GACGGGGTCT	TTGGTGACTG	TAGCCGAGCA	450
circopormeeh	401	GCTGTGAGTA	CCCTTTGGA	GACGGGGTCT	TTGGTGACTG	TAGCCGAGCA	450
circopordfp	401	GCTGTGAGTA	CCCTTTGGA	GACGGGGTCT	TTGGTGACTG	TAGCCGAGCA	450
		460	470	480	490	500	
circopormank	451	GTTCCCTGTA	ACGTATGTGA	GAAATTTCGG	CGGGCTGGCT	GAACTTTGAA	500
circopormeeh	451	GTTCCCTGTA	ACGTATGTGA	GAAATTTCGG	CGGGCTGGCT	GAACTTTGAA	500
circopordfp	451	GTTCCCTGTA	ACGTATGTGA	GAAATTTCGG	CGGGCTGGCT	GAACTTTGAA	500
		510	520	530	540	550	
circopormank	501	AAGTGAGCGG	GAAGATGCAG	CAGCGTGATT	GGAAGACAGC	TGTACACGTC	550
circopormeeh	501	AAGTGAGCGG	GAAGATGCAG	CAGCGTGATT	GGAAGACAGC	TGTACACGTC	550
circopordfp	501	AAGTGAGCGG	GAAGATGCAG	CAGCGTGATT	GGAAGACAGC	TGTACACGTC	550
		560	570	580	590	600	
circopormank	551	ATAGTGGGCC	CGCCCGGTTG	TGGGAAGAGC	CAGTGGGCC	GTAATTTGCA	600
circopormeeh	551	ATAGTGGGCC	CGCCCGGTTG	TGGGAAGAGC	CAGTGGGCC	GTAATTTGCA	600
circopordfp	551	ATAGTGGGCC	CGCCCGGTTG	TGGGAAGAGC	CAGTGGGCC	GTAATTTGCA	600

	610	620	630	640	650	
circopormank	601 TGAGCCTAGC	GACACCTACT	GGAAGCCTAG	TAGAAATAAG	TGGTGGGATG	650
circopormeeh	601 TGAGCCTAGG	GACACCTACT	GGAAGCCTAG	TAGAAATAAG	TGGTGGGATG	650
circopordfp	601 TGAGCCTAGG	GACACCTACT	GGAAGCCTAG	TAGAAATAAG	TGGTGGGATG	650
	660	670	680	690	700	
circopormank	651 GATATCATGG	AGAAGAAGTT	GTTGTTTTGG	ATGATTTTTA	TGGCTGGTTA	700
circopormeeh	651 GATATCATGG	AGAAGAAGTT	GTTGTTTTGG	ATGATTTTTA	TGGCTGGTTA	700
circopordfp	651 GATATCATGG	AGAAGAAGTT	GTTGTTTTGG	ATGATTTTTA	TGGCTGGTTA	700
	710	720	730	740	750	
circopormank	701 CCTTGGGATG	ATCTACTGAG	ACTGTGTGAC	CGGTATCCAT	TGACTGTAGA	750
circopormeeh	701 CCTTGGGATG	ATCTACTGAG	ACTGTGTGAC	CGGTATCCAT	TGACTGTAGA	750
circopordfp	701 CCTTGGGATG	ATCTACTGAG	ACTGTGTGAC	CGGTATCCAT	TGACTGTAGA	750
	760	770	780	790	800	
circopormank	751 GACTAAAGGC	GGTACTGTTC	CTTTTTGGC	TGGCAGTATT	TTGATTACCA	800
circopormeeh	751 GACTAAAGGG	GGTACTGTTC	CTTTTTGGC	CCGCAGTATT	TTGATTACCA	800
circopordfp	751 GACTAAAGGG	GGTACTGTTC	CTTTTTGGC	CCGCAGTATT	TTGATTACCA	800
	810	820	830	840	850	
circopormank	801 GCAATCAGGC	CCCCCAGGAA	TGGTACTCCT	CAACTGCTGT	CCCAGCTGTA	850
circopormeeh	801 GCAATCAGGC	CCCCCAGGAA	TGGTACTCCT	CAACTGCTGT	CCCAGCTGTA	850
circopordfp	801 GCAATCAGGC	CCCCCAGGAA	TGGTACTCCT	CAACTGCTGT	CCCAGCTGTA	850
	860	870	880	890	900	
circopormank	851 GAAGCTCTCT	ATCGGAGGAT	TACTACTTTG	CAATTTGGA	AGACTGCTGG	900
circopormeeh	851 GAAGCTCTCT	ATCGGAGGAT	TACTACTTTG	CAATTTGGA	AGACTGCTGG	900
circopordfp	851 GAAGCTCTCT	ATCGGAGGAT	TACTACTTTG	CAATTTGGA	AGACTGCTGG	900
	910	920	930	940	950	
circopormank	901 AGAACAAATCA	ACGGAGGTAC	CCGAAGGECG	ATTTGAAGCA	STGGACCCAC	950
circopormeeh	901 AGAACAAATCC	ACGGAGGTAC	CCGAAGGCCG	ATTTGAAGCA	STGGACCCAC	950
circopordfp	901 AGAACAAATCC	ACGGAGGTAC	CCGAAGGCCG	ATTTGAAGCA	STGGACCCAC	950
	960	970	980	990	1000	
circopormank	951 CCTGTGCCCT	TTTCCCATAT	AAAATAAATT	ACTGAGTCTT	TTTTGTTATC	1000
circopormeeh	951 CCTGTGCCCT	TTTCCCATAT	AAAATAAATT	ACTGAGTCTT	TTTTGTTATC	1000
circopordfp	951 CCTGTGCCCT	TTTCCCATAT	AAAATAAATT	ACTGAGTCTT	TTTTGTTATC	1000
	1010	1020	1030	1040	1050	
circopormank	1001 ACATCGTAAT	GGTTTTTATT	TTTATTTATT	TAGAGGGTCT	TTTAGGATAAA	1050
circopormeeh	1001 ACATCGTAAT	GGTTTTTATT	TTTATTTATT	TAGAGGGTCT	TTTAGGATAAA	1050
circopordfp	1001 ACATCGTAAT	GGTTTTTATT	TTTATTTATT	TAGAGGGTCT	TTTAGGATAAA	1050
	1060	1070	1080	1090	1100	
circopormank	1051 ATTCTCTGAA	TTGTACATAA	ATAGTCAGCC	TTACCACATA	TTTTGGGCT	1100
circopormeeh	1051 ATTCTCTGAA	TTGTACATAA	ATAGTCAGCC	TTACCACATA	TTTTGGGCT	1100
circopordfp	1051 ATTCTCTGAA	TTGTACATAA	ATAGTCAGCC	TTACCACATA	TTTTGGGCT	1100
	1110	1120	1130	1140	1150	
circopormank	1101 GTGGCTGCAT	TTTGGAGCGC	ATAGCCGAGG	CCTGTGTGCT	CGACATTGGT	1150
circopormeeh	1101 GTGGCTGCAT	TTTGGAGCGC	ATAGCCGAGG	CCTGTGTGCT	CGACATTGGT	1150
circopordfp	1101 GTGGCTGCAT	TTTGGAGCGC	ATAGCCGAGG	CCTGTGTGCT	CGACATTGGT	1150
	1160	1170	1180	1190	1200	
circopormank	1151 GTGGGTATTT	AAATGGAGCC	ACAGCTGGTT	TCTTTTATTAA	TTTGGGTGGA	1200
circopormeeh	1151 GTGGGTATTT	AAATGGAGCC	ACAGCTGGTT	TCTTTTATTAA	TTTGGGTGGA	1200
circopordfp	1151 GTGGGTATTT	AAATGGAGCC	ACAGCTGGTT	TCTTTTATTAA	TTTGGGTGGA	1200

		1210	1220	1230	1240	1250	
circopormank	1201	ACCAATCAAT	TGTTTGGTCC	AGCTCAGGTT	TGGGGGTGAA	GTACCTGGAG	1250
circopormeeh	1201	ACCAATCAAT	TGTTTGGTCC	AGCTCAGGTT	TGGGGGTGAA	GTACCTGGAG	1250
circopordfp	1201	ACCAATCAAT	TGTTTGGTCT	AGCTCAGGTT	TGGGGGTGAA	GTACCTGGAG	1250
		1260	1270	1280	1290	1300	
circopormank	1251	TGGTAGGTAA	AGGGCTGCCT	TATGGTGTGG	CGGGAGGAGT	AGTTAATATA	1300
circopormeeh	1251	TGGTAGGTAA	AGGGCTGCCT	TATGGTGTGG	CGGGAGGAGT	AGTTAATATA	1300
circopordfp	1251	TGGTAGGTAA	AGGGCTGCCT	TATGGTGTGG	CGGGAGGAGT	AGTTAATATA	1300
		1310	1320	1330	1340	1350	
circopormank	1301	GGGGTCATAG	GCCAAGTTGG	TGGAGGGGGT	TACAAAGTTG	GCATCCAAGA	1350
circopormeeh	1301	GGGGTCATAG	GCCAAGTTGG	TGGAGGGGGT	TACAAAGTTG	GCATCCAAGA	1350
circopordfp	1301	GGGGTCATAG	GCCAAGTTGG	TGGAGGGGGT	TACAAAGTTG	GCATCCAAGA	1350
		1360	1370	1380	1390	1400	
circopormank	1351	TAACAACAGT	GGACCCAAACA	CCTCTTGTAT	TAGAGGTGAT	GGGGTCTCTG	1400
circopormeeh	1351	TAACAACAGT	GGACCCAAACA	CCTCTTGTAT	TAGAGGTGAT	GGGGTCTCTG	1400
circopordfp	1351	TAACAACAGT	GGACCCAAACA	CCTCTTGTAT	TAGAGGTGAT	GGGGTCTCTG	1400
		1410	1420	1430	1440	1450	
circopormank	1401	GGGTAAAATT	CATATTTAGC	CTTCTTAATA	CGGTAGTATT	GGAAAGGTAG	1450
circopormeeh	1401	GGGTAAAATT	CATATTTAGC	CTTCTTAATA	CGGTAGTATT	GGAAAGGTAG	1450
circopordfp	1401	GGGTAAAATT	CATATTTAGC	CTTCTTAATA	CGGTAGTATT	GGAAAGGTAG	1450
		1460	1470	1480	1490	1500	
circopormank	1451	GGGTAGGGGG	TTGGTGCCGC	CTGAGGGGGG	GAGGAACCTGG	CCGATGTTGA	1500
circopormeeh	1451	GGGTAGGGGG	TTGGTGCCGC	CTGAGGGGGG	GAGGAACCTGG	CCGATGTTGA	1500
circopordfp	1451	GGGTAGGGGG	TTGGTGCCGC	CTGAGGGGGG	GAGGAACCTGG	CCGATGTTGA	1500
		1510	1520	1530	1540	1550	
circopormank	1501	ATCTGAGGTG	GTTAACATGC	CAAGATGGCT	GCGAGTATCC	TCCCTTTATG	1550
circopormeeh	1501	ATCTGAGGTG	GTTAACATTC	CAAGATGGCT	GCGAGTATCC	TCCCTTTATG	1550
circopordfp	1501	ATCTCAGCTC	GTTAACATTC	CAAGATGGCT	GCGAGTATCC	TCCCTTTATG	1550
		1560	1570	1580	1590	1600	
circopormank	1551	GTGAACTACAA	ATTCTTCTAGA	AAGGCGGCAA	TTGAAGATAC	CCGTCTTTCG	1600
circopormeeh	1551	GTGAGTACAA	ATTCTTCTAGA	AAGGCGGGAA	TTGAAGATAC	CCGTCTTTCG	1600
circopordfp	1551	GTGAGTACAA	ATTCTTCTAGA	AAGGCGGGAA	TTGAAGATAC	CCGTCTTTCG	1600
		1610	1620	1630	1640	1650	
circopormank	1601	GCGCCATCTG	TAACGGTTTC	TGAAGGCGGG	GTGTGCCAAA	TATGGTCTTC	1650
circopormeeh	1601	GCGCCATCTG	TAACGGTTTC	TGAAGGCGGG	GTGTGCCAAA	TATGGTCTTC	1650
circopordfp	1601	GCGCCATCTG	TAACGGTTTC	TGAAGGCGGG	GTGTGCCAAA	TATGGTCTTC	1650
		1660	1670	1680	1690	1700	
circopormank	1651	TCCGGAGGAT	GTTTCCAAGA	TGGCTGCGGG	GGCGGGTCCT	TCTTCTGC GG	1700
circopormeeh	1651	TCCGGAGGAT	GTTTCCAAGA	TGGCTGCGGG	GGCGGGTCCT	TCTTCTGC GG	1700
circopordfp	1651	TCCGGAGGAT	GTTTCCAAGA	TGGCTGCGGG	GGCGGGTCCT	TCTTCTGC GG	1700
		1710	1720	1730	1740	1750	
circopormank	1701	TAACGCCCTCC	TTGGCCACGT	CATCCTATAAA	AAGTGAAAGA	AGTGCCTGTC	1750
circopormeeh	1701	TAACGCCCTCC	TTGGCCACGT	CATCCTATAAA	AAGTGAAAGA	AGTGCCTGTC	1750
circopordfp	1701	TAACGCCCTCC	TTGGCCACGT	CATCCTATAAA	AAGTGAAAGA	AGTGCCTGTC	1750
		1760	1770	1780	1790	1800	
circopormank	1751	TGTAGTATT	1800
circopormeeh	1751	TGTAGTATT	1800
circopordfp	1751	TGTAGTATT	1800

	10	20	30	40	50	
circopormank	1 MPSKKSGPQP	HKRWVFTLNN	PSEEEKNKIR	ELPISLFDYF	VCGEEGLEEG	50
circopormeeh	1 MPSKKSGPQP	HKRWVFTLNN	PSEEEKNKIR	ELPISLFDYF	VCGEEGLEEG	50
circopordfp[1 MPSKKSGPQP	HKRWVFTLNN	PSEEEKNKIR	ELPISLFDYF	VCGEEGLEEG	50
	60	70	80	90	100	
circopormank	51 RTAHLQGFAN	FAKKQTFNKV	KWYFGARCHI	EAKAKGTDQQN	KEYCSKEGH	100
circopormeeh	51 RTPHLQGFAN	FAKKQTFNKV	KWYFGARCHI	EAKAKGTDQQN	KEYCSKEGH	100
circopordfp[51 RTPHLQGFAN	FAKKQTFNKV	KWYFGARCHI	EAKAKGTDQQN	KEYCSKEGH	100
	110	120	130	140	150	
circopormank	101 IECGAPRNQ	GKRSDLSTAV	STLLETGSVL	TVAEQFPVTY	VRNFRGLAEL	150
circopormeeh	101 IECGAPRNQ	GKRSDLSTAV	STLLETGSVL	TVAEQFPVTY	VRNFRGLAEL	150
circopordfp[101 IECGAPRNQ	GKRSDLSTAV	STLLETGSVL	TVAEQFPVTY	VRNFRGLAEL	150
	160	170	180	190	200	
circopormank	151 KVSGKMQQR	DWKTAHVIV	GPPGCGKSQW	ARNFAEPSDT	YWKPNSRNKWW	200
circopormeeh	151 KVSGKMQQR	DWKTAHVIV	GPPGCGKSQW	ARNFAEPRDT	YWKPNSRNKWW	200
circopordfp[151 KVSGKMQQR	DWKTAHVIV	GPPGCGKSQW	ARNFAEPRDT	YWKPNSRNKWW	200
	210	220	230	240	250	
circopormank	201 DGYHGEEVVV	LDDFYGWLPW	DDLLRLCDRY	PLTVETKGGT	VPFLARSIL	250
circopormeeh	201 DGYHGEEVVV	LDDFYGWLPW	DDLLRLCDRY	PLTVETKGGT	VPFLARSIL	250
circopordfp[201 DGYHGEEVVV	LDDFYGWLPW	DDLLRLCDRY	PLTVETKGGT	VPFLARSIL	250
	260	270	280	290	300	
circopormank	251 TSNQAPQEWT	SSTAVPAVEA	LYRRITTLQF	WKTAGEQSTE	VPEGRFEAVD	300
circopormeeh	251 TSNQAPQEWT	SSTAVPAVEA	LYRRITTLQF	WKTAGEQSTE	VPEGRFEAVD	300
circopordfp[251 TSNQAPQEWT	SSTAVPAVEA	LYRRITTLQF	WKTAGEQSTE	VPEGRFEAVD	300
	310	320	330	340	350	
circopormank	301 PPCALFPYKI	NY*.....	350
circopormeeh	301 PPCALFPYKI	NY*.....	350
circopordfp[301 PPCALFPYKI	NY*.....	350

		10	20	30	40	50	
circopormank	1	MTWP RR YRR	RRTRPRSHLG	NILRRR P YLA	HPAFRNRYRW	RRKTGIFNCR	50
circopormeeh	1	MTWP RR YRR	RRTRPRSHLG	NILRRR P YLA	HPAFRNRYRW	RRKTGIFNSR	50
circopordfp[1	MTWP RR YRR	RRTRPRSHLG	NILRRR P YLV	HPAFRNRYRW	RRKTGIFNSR	50
		60	70	80	90	100	
circopormank	51	LSEFVLTIK	GGYSQPSWIV	NHLRFNIGQF	LPPSGGTNPL	PLPFQYYRIR	100
circopormeeh	51	LSEFVLTIK	GGYSQPSWNV	NYL F NIGQF	LPPSGGTNPL	PLPFQYYRIR	100
circopordfp[51	LSEFVLTIR	GG S QPSWNV	NELRFNIGQF	LPPSGGTNPL	PLPFQYYRIR	100
		110	120	130	140	150	
circopormank	101	KAKYE F YPRD	PITSNERGVG	STVVILDANF	VTPSTNLAYD	PYINYSSRHT	150
circopormeeh	101	KAKYE F YPRD	PITSNQRGVG	STVVILDANF	VTPSTNLAYD	PYINYSSRHT	150
circopordfp[101	KAKYE F YPRD	PITSNQRGVG	STVVILDANF	VTPSTNLAYD	PYINYSSRHT	150
		160	170	180	190	200	
circopormank	151	IRQPFTYHSR	YFTP K PELDQ	TIDWFH P NNK	RNQLWLHLNT	HTNVEHTGLG	200
circopormeeh	151	IRQPFTYHSR	YFTP K PELDQ	TIDWFH P NNK	RNQLWLHLNT	HTNVEHTGLG	200
circopordfp[151	IRQPFTYHSR	YFTP K PELDQ	TIDWF H PNNK	RNQLWLHLNT	HTNVEHTGLG	200
		210	220	230	240	250	
circopormank	201	YALQNAATAQ	NYVVRLTIYV	QFREFILKDP	LNK.....	250
circopormeeh	201	YALQNAATAQ	NYVVRLTIYV	QFREFILKDP	LNK.....	250
circopordfp[201	YALQNAATAQ	NYVVRLTIYV	QFREFILKDP	LNE.....	250

FIGURE 9

		10	20	30	40	50	
circopormank	1	MISIPPLIST	RLPVGV V RLS	KITGPLALPT	TGRAHYDVYS	CLPITLLHLP	50
circopormeeh	1	MISIPPLIST	RLPVGV V RLS	KITGPLALPT	TGRAHYDVYS	CLPITLLHLP	50
circopordfp[1	MISIPPLIST	RLPVGV V RLS	KITGPLALPT	TGRAHYDVYS	CLPITLLHLP	50
		60	70	80	90	100	
circopormank	51	AHFQKF S QPA	EISHIRYREL	LGYSHQRPRL	QKGTHSSRQV	AALPLVPRSS	100
circopormeeh	51	AHFQKF S QPA	EISHIRYREL	LGYSHQRPRL	QKGTHSSRQV	AALPLVPRSS	100
circopordfp[51	AHFQKF S QPA	EISHIRYRKL	LGYSHQRPRL	QKGTHSSRQV	AALPLVPRSS	100
		110	120	130	140	150	
circopormank	101	TLDKYVAFFT	AVFFILLVGS	FRFLDVAAGT	KIPLH L VKSL	LLSKISKPLE	150
circopormeeh	101	TLDKYVAFFT	AVFFILLVGS	FRFLDVAAGT	KIPLH L VKSL	LLSKIRKPLE	150
circopordfp[101	TLDKYVAFFT	AVFFILLVGS	FRFLDVAAGT	KIPLH L VKSL	LLSKIRKPLE	150
		160	170	180	190	200	
circopormank	151	VSSSTLFQTF	LSANKIIKKG	DWKLPYFVFL	LLGRIIKGEH	PPLMGLRAAF	200
circopormeeh	151	VRSSTLFQTF	LSANKIIKKG	DWKLPYFVFL	LLGRIIKGEH	PPLMGLRAAF	200
circopordfp[151	VRSSTLFQTF	ATNKKIIKKG	DWKLPYFVFL	LLGRIIKGEH	PPLMGLRAAF	200
		210	220	230	240	250	
circopormank	201	LAWHFH	250
circopormeeh	201	LAWHFH	250
circopordfp[201	LAWHFH	250

CABINET REGIMEAU

FIGURE 10

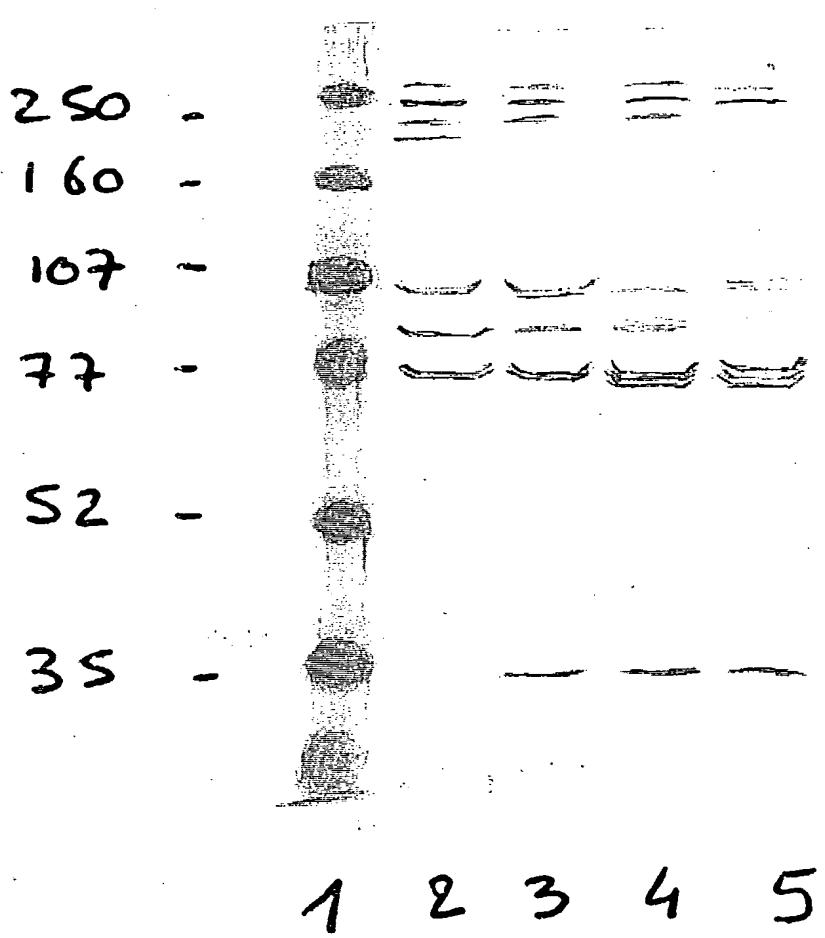


FIGURE 11

REVENDICATIONS

1. Séquence nucléotidique de séquence SEQ ID N° 1 du génome de circovirus MAP.

5

2. Séquence nucléotidique de circovirus MAP, caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi :

- a) une séquence nucléotidique de fragment spécifique de la séquence SEQ ID N° 1 ;
- 10 b) une séquence nucléotidique homologue à une séquence nucléotidique telle que définie en a) ;
- c) une séquence nucléotidique complémentaire de la séquence SEQ ID N° 1 ou complémentaire d'une séquence nucléotidique telle que définie en a) ou b), et une séquence nucléotidique de leur ARN correspondant ;
- 15 d) une séquence nucléotidique capable de s'hybrider dans des conditions stringentes avec une séquence telle que définie en a), b), ou c) ;
- e) une séquence nucléotidique comprenant la séquence SEQ ID N° 1 ou une séquence telle que définie en a), b), c) ou d) ; et
- f) une séquence nucléotidique modifiée d'une séquence nucléotidique telle que définie en a), b), c), d) ou e).

25 3. Séquence nucléotidique selon la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi les séquences ORF1 à ORF3.

30 4. Séquence nucléotidique selon la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence nucléotidique choisie parmi :

- a) une séquence nucléotidique ORF1, ORF2 ou ORF3 selon la revendication 3 ;
- b) une séquence nucléotidique de fragment spécifique d'une séquence ORF1, ORF2 ou ORF3 selon la revendication 3 ou d'une séquence telle que définie en a) ;

c) une séquence nucléotidique homologue comportant au moins 80 % d'identité avec une séquence nucléotidique ORF1, ORF2 ou ORF3 selon la revendication 3 ou telle que définie en a) ou b) ;

5 d) une séquence nucléotidique complémentaire ou d'ARN correspondant à une séquence ORF1, ORF2 ou ORF3 selon la revendication 3 ou telle que définie en a), b) ou c) ; et

e) une séquence nucléotidique modifiée d'une séquence ORF1, ORF2 ou ORF3 selon la revendication 3 ou telle que définie en a), b), c), ou d).

10

5. Séquence nucléotidique selon l'une des revendications 2 à 4, caractérisée en ce que la séquence nucléotidique de fragment spécifique comprend une séquence nucléotidique choisie parmi les séquences suivantes :

a) 5' TGTGGCGA 3' ;

b) 5' AGTTTCCT 3' ;

c) 5' TCATTTAGAGGGTCTTCAG 3' ;

20 d) 5' GTCAACCT 3' ;

e) 5' GTGGTTGC 3' ;

f) 5' AGCCCAGG 3' ;

g) 5' TTGGCTGG 3' ;

h) 5' TCTAGCTCTGGT 3' ;

25 i) 5' ATCTCAGCTCGT 3' ;

j) 5' TGTCCTCCCTCTT 3' ;

k) 5' TCTCTAGA 3' ;

l) 5' TGTACCAA 3' ;

m) 5' TCCGTCTT 3' ; et leur séquence complémentaire.

30

6. Polypeptide codé par une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 1 à 5, à l'exclusion du polypeptide de séquence SEQ ID N° 2.

35 7. Polypeptide selon la revendication 6, caractérisé en ce que sa séquence est représentée par un fragment spécifique d'une des six séquences d'acides aminés

représentées à la figure 3.

8. Polypeptide selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les séquences SEQ ID N° 3 et 5 SEQ ID N° 4.

9. Polypeptide caractérisé en ce qu'il comprend un polypeptide choisi parmi :

- a) un polypeptide selon la revendication 8 ou un 10 polypeptide de séquence SEQ ID N° 2 ;
- b) un fragment spécifique d'au moins 5 acides aminés d'un polypeptide selon la revendication 8, ou tel que défini en a) ;
- c) un polypeptide homologue à un polypeptide selon la 15 revendication 8, ou tel que défini en a) ou b) ;
- d) un fragment spécifique biologiquement actif d'un polypeptide selon la revendication 8, ou tel que défini en a), b) ou c) ;
- e) un polypeptide modifié d'un polypeptide selon la 20 revendication 8, ou tel que défini en a), b), c) ou d) ; et en ce que ledit polypeptide ainsi caractérisé n'est pas le polypeptide de séquence SEQ ID N° 2.

10. Séquence nucléotidique codant pour un polypeptide 25 selon la revendication 9.

11. Séquence nucléotidique utilisable comme amorce ou sonde, caractérisée en ce que ladite séquence est choisie parmi les séquences nucléotidiques selon l'une des 30 revendications 1 à 5, et 10.

12. Séquence nucléotidique selon la revendication 11, caractérisée en ce que ladite séquence est l'une des amorces de couple d'amorces choisie parmi les couples 35 suivants :

- a) 5' GTG TGC TCG ACA TTG GTG TG 3', et 5' TGG AAT GTT AAC GAG CTG AG 3' ;

b) 5' GTG TGC TCG ACA TTG GTG TG 3', et
5' CTC GCA GCC ATC TTG GAA TG 3';
c) 5' CGC GCG TAA TAC GAC TCA CT 3', et
5' GTG TGC TCG ACA TTG GTG TG 3';
5 d) 5' CGC GCG TAA TAC GAC TCA CT 3', et
5' CTC GCA GCC ATC TTG GAA TG 3'.

13. Séquence nucléotidique selon l'une des revendications 11 et 12, caractérisée en ce qu'elle est marquée par un composé radioactif ou par un composé non radioactif.

14. Séquence nucléotidique selon l'une des revendications 11 à 13, caractérisée en ce quelle est immobilisée sur un support, de manière covalente ou non covalente.

15. Séquence nucléotidique selon l'une des revendications 10 à 12, pour la détection et/ou l'amplification de séquences nucléiques.

16. Vecteur de clonage, et/ou d'expression, caractérisé en ce qu'il contient une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 1 à 5, et 10.

25

17. Vecteur caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 1 à 5, et 10, et en ce qu'il comprend en outre un gène d'intérêt.

30

18. Particule ou pseudoparticule virale générée à partir d'un vecteur selon l'une des revendications 16 et 17.

35 19. Cellule hôte, caractérisée en ce qu'elle est transformée par un vecteur selon l'une des revendications

16 et 17, ou une particule virale selon la revendication 18.

20. Animal, comprenant une cellule transformée selon 5 la revendication 19.

21. Procédé de préparation d'un polypeptide, caractérisé en ce qu'il met en oeuvre un vecteur selon l'une des revendications 16 et 17, une cellule transformée 10 par ledit vecteur et/ou un animal comprenant ladite cellule transformée.

22. Polypeptide recombinant susceptible d'être obtenu par un procédé selon la revendication 21.

15

23. Procédé de préparation d'un polypeptide synthétique, caractérisé en ce qu'il utilise une séquence d'acides aminés d'un polypeptide selon l'une des revendications 6 à 9.

20

24. Polypeptide synthétique obtenu par un procédé selon la revendication 23.

25. Polypeptide hybride, caractérisé en ce qu'il comporte au moins la séquence d'un polypeptide selon l'une des revendications 6 à 9, 22 et 24 et une séquence d'un polypeptide susceptible d'induire une réponse immunitaire chez l'homme ou l'animal.

30

26. Polypeptide hybride selon la revendication 25, caractérisé en ce qu'il comporte au moins la séquence d'un polypeptide selon l'une des revendications 6 à 9, 22 et 24, et une séquence d'un polypeptide susceptible d'induire une réponse humorale et/ou cellulaire chez l'homme ou l'animal.

35

27. Séquence nucléotidique codant pour un polypeptide hybride selon l'une des revendications 25 et 26.

28. Vecteur caractérisé en ce qu'il contient une séquence nucléotidique selon la revendication 27.

5 29. Polypeptide hybride selon l'une des revendications 25 et 26, caractérisée en ce qu'il s'agit d'un polypeptide recombinant obtenu par la mise en œuvre d'un vecteur selon la revendication 28.

10 30. Procédé pour la détection et/ou l'identification de circovirus MAP dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
a) mise en contact de l'échantillon biologique avec un polypeptide selon l'une des revendications 6 à 9, 22 et
15 24 ;
b) mise en évidence du complexe antigène-anticorps éventuellement formé.

20 31. Kit ou nécessaire pour la détection et/ou l'identification de circovirus MAP, caractérisé en ce qu'il comprend les éléments suivants :
a) un polypeptide selon l'une des revendications 6 à 9, 22 et 24 ;
b) le cas échéant, les réactifs pour la constitution du milieu propice à la réaction immunologique ;
25 c) les réactifs permettant la mise en évidence des complexes antigène-anticorps éventuellement formés entre le ou les polypeptides de l'invention et les anticorps ;
d) le cas échéant, un échantillon biologique de référence (témoin négatif) dépourvu d'anticorps reconnus par ledit polypeptide ;
e) le cas échéant, un échantillon biologique de référence (témoin positif) contenant une quantité prédéterminée d'anticorps reconnus par ledit polypeptide.

35

32. Anticorps mono- ou polyclonaux, leurs fragments, ou anticorps chimériques, caractérisés en ce qu'ils sont

capables de reconnaître spécifiquement un polypeptide selon l'une des revendications 6 à 9, 22 et 24.

33. Anticorps selon la revendication 32, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un anticorps marqué.

34. Procédé pour la détection et/ou l'identification de circovirus MAP dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 10 a) mise en contact de l'échantillon biologique avec un anticorps selon l'une des revendications 32 ou 33 ;
- b) mise en évidence du complexe antigène-anticorps formé.

35. Kit ou nécessaire pour la détection et/ou l'identification de circovirus MAP, caractérisé en ce qu'il comprend les éléments suivants :

- a) un anticorps polyclonal ou monoclonal selon l'une des revendications 32 ou 33 ;
- b) le cas échéant, les réactifs pour la constitution du milieu propice à la réaction immunologique ;
- c) les réactifs permettant la mise en évidence des complexes antigène-anticorps produits par la réaction immunologique.

25 36. Procédé de détection et/ou d'identification de circovirus MAP dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il met en oeuvre une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 11 à 15.

30 37. Procédé selon la revendication 36, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes :

- a) le cas échéant, isolement de l'ADN à partir de l'échantillon biologique à analyser ;
- b) amplification spécifique de l'ADN de circovirus MAP à l'aide d'au moins une amorce selon l'une des revendications 11 à 15 ;
- c) mise en évidence des produits d'amplification.

Documents reçus
le : 16-01-99
Non examinés par
l'I.N.P.I.

38. Procédé selon la revendication 36, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) mise en contact d'une sonde nucléotidique selon l'une des revendications 11 à 15 avec un échantillon biologique, l'ADN contenu dans l'échantillon biologique ayant, le cas échéant, préalablement été rendu accessible à l'hybridation, dans des conditions permettant l'hybridation de la sonde à l'ADN de l'échantillon ;

10 b) mise en évidence de l'hybride éventuellement formé entre la sonde nucléotidique et l'ADN de l'échantillon biologique.

39. Procédé selon la revendication 36, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) mise en contact d'une sonde nucléotidique immobilisée sur un support selon la revendication 14, avec un échantillon biologique, l'ADN de l'échantillon, ayant, le cas échéant, été préalablement rendu accessible à l'hybridation, dans des conditions permettant l'hybridation de la sonde à l'ADN de l'échantillon ;

20 b) mise en contact de l'hybride formé entre la sonde nucléotidique immobilisée sur un support et l'ADN contenu dans l'échantillon biologique, le cas échéant après élimination de l'ADN de l'échantillon biologique n'ayant pas hybridé avec la sonde, avec une sonde nucléotidique marquée selon la revendication 13 ;

25 c) mise en évidence du nouvel hybride formé à l'étape b).

30 40. Procédé selon la revendication 39, caractérisé en ce que, préalablement à l'étape a), l'ADN de l'échantillon biologique, est amplifié à l'aide d'au moins une amorce selon l'une des revendications 11 à 15.

35 41. Kit ou nécessaire pour la détection et/ou l'identification de circovirus MAP associé, caractérisé en ce qu'il comprend les éléments suivants :

- a) une sonde nucléotidique selon l'une des revendications 11 à 15 ;
- b) le cas échéant, les réactifs nécessaires à la mise en oeuvre d'une réaction d'hybridation ;
- 5 c) le cas échéant, au moins une amorce selon l'une des revendications 11 à 15, ainsi que les réactifs nécessaires à une réaction d'amplification de l'ADN.

42. Kit ou nécessaire pour la détection et/ou 10 l'identification de circovirus MAP, caractérisé en ce qu'il comprend les éléments suivants :

- a) une sonde nucléotidique, dite sonde de capture, selon la revendication 14 ;
- b) une sonde oligonucléotidique, dite sonde de révélation, 15 selon la revendication 13 ;
- c) le cas échéant, au moins une amorce selon l'une des revendications 11 à 15, ainsi que les réactifs nécessaires à une réaction d'amplification de l'ADN.

20 43. Kit ou nécessaire pour la détection et/ou l'identification de circovirus MAP, caractérisé en ce qu'il comprend les éléments suivants :

- a) au moins une amorce selon l'une des revendications 11 à 15 ;
- b) le cas échéant, les réactifs nécessaires pour effectuer 25 une réaction d'amplification d'ADN ;
- c) le cas échéant, un composant permettant de vérifier la séquence du fragment amplifié, plus particulièrement une sonde oligonucléotidique selon l'une des revendications 30 11 à 15.

44. Procédé ou kit ou nécessaire selon l'une des revendications 30 à 43, pour le diagnostic d'une infection par le circovirus MAP.

35

45. Utilisation d'une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 1 à 5, et 10, d'un polypeptide

selon l'une des revendications 6 à 9, 22 et 24, d'un anticorps selon l'une des revendications 32 et 33, d'une cellule selon la revendication 19, et/ou d'un animal transformé selon la revendication 20, pour la sélection de 5 composés organiques ou inorganiques capables de moduler, d'induire ou d'inhiber l'expression de gènes, et/ou de modifier la réplication cellulaire du circovirus MAP ou capable d'induire ou d'inhiber chez le porc les pathologies liées à une infection par le circovirus MAP.

10

46. Méthode de sélection de composé capable de se lier à un polypeptide selon l'une des revendications 6 à 9, 22 et 24, capable de se lier à une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 1 à 5, et 10, ou capable de 15 reconnaître un anticorps selon la revendication 32, et/ou capable de moduler, d'induire ou d'inhiber l'expression de gènes, et/ou de modifier la réplication cellulaire du circovirus MAP, ou capable d'induire ou d'inhiber chez le 20 porc les pathologies liées à une infection par le circovirus MAP, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

a) mise en contact dudit composé avec ledit polypeptide, ladite séquence nucléotidique, avec une cellule transformée selon la revendication 19, et/ou 25 administration dudit composé à un animal transformé selon la revendication 20 ;

b) détermination de l'activité dudit composé.

47. Composé susceptible d'être sélectionné par une 30 méthode selon la revendication 46.

48. Composition pharmaceutique comprenant un composé choisi parmi les composés suivants :

a) une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 1 à 5, et 10 ;

b) un polypeptide selon l'une des revendications 6 à 9, 22, 24 à 26, et 29 ;

- c) un vecteur ou une particule virale selon l'une des revendications 16 à 18, et 28, ou une cellule selon la revendication 19 ;
- d) un anticorps selon la revendication 32 ; et
- 5 e) un composé selon la revendication 47.

49. Composition selon la revendication 48, éventuellement en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

10

50. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 48 et 49 pour la prévention ou le traitement d'une infection par le circovirus MAP.

15

51. Composition vaccinale, caractérisée en ce qu'elle comprend un ou plusieurs polypeptides selon l'une des revendications 6 à 9, 22 et 24 et/ou un ou plusieurs polypeptides hybrides selon l'une des revendications 25, 26 et 29.

20

52. Utilisation d'une cellule selon la revendication 19, pour la préparation d'une composition vaccinale.

25

53. Composition vaccinale, caractérisée en ce qu'elle contient une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 1 à 5, 10 et 27, un vecteur selon l'une des revendications 16, 17 et 28, et/ou une cellule selon la revendication 19.

30

54. Composition vaccinale selon l'une des revendications 51 et 53, pour la prévention ou le traitement d'une infection par le circovirus MAP.

35

55. Composition vaccinale selon l'une des revendications 51, 53 et 54, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable et, le cas échéant, un ou plusieurs adjuvants de l'immunité appropriés.

56. Vecteur selon la revendication 17, particule virale selon la revendication 18, ou cellule selon la revendication 19, pour le traitement et/ou la prévention d'une maladie par thérapie génique.

5

57. Composition pharmaceutique comprenant à titre d'agent thérapeutique ou prophylactique, un vecteur selon la revendication 17, une particule virale selon la revendication 18 ou une cellule selon la revendication 19.

10

INPI

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIETE
INDUSTRIELLE

P A T E N T

UTILITY CERTIFICATE - CERTIFICATE OF ADDITION

OFFICIAL COPY

The Director-General of the Institut National de la Propriété Industrielle certifies that the attached document is a true copy of an application for industrial property titleright filed at the Institute.

Drawn up in Paris, 14 MARCH 2003

On behalf of the Director-General of the
Institut National de la Propriété Industrielle
The Patent Department Head

(signature)

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIETE
INDUSTRIELLE

REGISTERED OFFICE
26bis, rue de Saint Petersbourg
75800 PARIS Cedex 08
Telephone: 33 (0)1 53 04 53 04
Fax: 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr

PATENT, UTILITY CERTIFICATE

Intellectual Property Code - Book VI

Cerfa
No. 55-1328

REQUEST FOR GRANT

Confirmation of filing by fax

This form is to be completed in black ink and in block capitals

Reserved for the INPI

DATE OF SUBMISSION OF THE DOCUMENTS 05 DEC. 1997
NATIONAL REGISTRATION 97/15.396
DEPARTMENT OF FILING 75
DATE OF FILING 05 DEC. 1997

1. NAME AND ADDRESS OF THE APPLICANT OR THE
REPRESENTATIVE TO WHOM THE CORRESPONDENCE IS TO
BE ADDRESSED

CABINET REGIMBEAU
26, Avenue Kléber
75116 PARIS

No. of permanent power of attorney	Correspondent's references	Telephone
		236822 D17221 MIP 01 45 00 92 02

2. APPLICATION Nature of the industrial property right
 patent divisional application
 utility certificate conversion of a European patent application patent
 → initial application ↓

utility certificate No. date

Compilation of the search report

deferred immediate

The applicant, as a physical person, asks to pay the fee by instalments

yes no

Title of the invention (maximum 200 characters)

Genomic sequence and polypeptides of the circovirus associated with piglet weight loss disease (PWD), applications to the diagnosis, prevention and/or treatment of the infection

3. APPLICANT(S) SIREN No. APE-NAF code

name and forenames (underline the surname) or company name

CENTRE NATIONAL D'ETUDES VETERINAIRES ET ALIMENTAIRES

Legal form

Public National Establishment

nationality/nationalities French

Full address(es)

Country

23, Avenue du Général de Gaulle, 94700 MAISONS-ALFORT

FR

If insufficient space, continue on plain paper

4. INVENTOR(S) The inventors are the applicants yes no If the answer is no, provide a separate designation

5. REDUCTION OF THE RATE OF FEES requested for the first time requested prior to filing; attach copy of the favourable decision

6. PRIORITY DECLARATION OR APPLICATION FOR THE BENEFIT OF THE FILING DATE OF A PRIOR APPLICATION

Country of origin

Number

Filing date

Nature of the application

7. DIVISIONS previous to the present application

No.

date

No.

date

8. SIGNATURE OF THE APPLICANT OR REPRESENTATIVE
(name and capacity of the signatory - registration No.)

SIGNATURE OF THE RECEIVING OFFICIAL

SIGNATURE AFTER
REGISTRATION OF THE
APPLICATION AT THE INPI

(illegible signature)

92-1001

(illegible signature)

INPIINSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIETE
INDUSTRIELLE**PATENT, UTILITY CERTIFICATE****PATENTS ADMINISTRATIVE DIVISION**

26bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 Paris Cédex 08
Tel: 01 53 04 53 04 - Fax: 01 42 93 59 30

DESIGNATION OF THE INVENTOR
(if the applicant is not the inventor or the sole inventor)

NATIONAL REGISTRATION NO.
97/15,396

TITLE OF THE INVENTION: Genomic sequence and polypeptides of the circovirus associated with piglet weight loss disease (PWD), applications to the diagnosis, prevention and/or treatment of the infection

THE UNDERSIGNED

CENTRE NATIONAL D'ETUDES VETERINAIRES ET ALIMENTAIRES
23, Avenue du Général de Gaulle, 94700 MAISONS-ALFORT

DESIGNE(S) AS INVENTOR(S) (surname underlined, forenames, address):

JESTIN André
14, rue Jacques Cartier
22000 Saint Brieuc, FR

ARNAULD Claire
34, Boulevard Clémenceau
22000 Saint Brieuc, FR

ALBINA Emmanuel
11, rue du Roussillon
22950 Tregueux, FR

LE CANN Pierre
La Noë de Craffault
22960 Pledran, FR

BLANCHARD Philippe
26, rue du 8 Mai 1945
22190 Plerin, FR

HUTET Evelyne
20, rue Vice Admiral Kersaint
Saint Laurent
22190 Plerin, FR

NOTE: In exceptional cases, the name of the inventor may be followed by that of the company to which he belongs (membership company) when the latter is other than the company which is the applicant or proprietor.

Date and signature(s) of the applicant(s) or of the representative

5 December 1997

CABINET REGIMBEAU

(illegible signature)

92-1001

DOCUMENT CONTAINING AMENDMENTS

* A change made in the wording of the original claims, unless the change derives from the provisions of Article 28 of the decree of 19th September 1979, is indicated by the reference "R.M." (amended claims).